

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



MEDIÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL EM VACAS HOLSTEIN-FRÍSIAS RECÉM-PARIDAS E
SUA PONTUAL UTILIZAÇÃO NA PRÁTICA CLÍNICA

SVIATLANA IVANOVNA BYSTROVA

ORIENTADOR:
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

COORIENTADOR:
Dr. Carsten Dammert

2019

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



MEDIÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL EM VACAS HOLSTEIN-FRÍSIAS RECÉM-PARIDAS E
SUA PONTUAL UTILIZAÇÃO NA PRÁTICA CLÍNICA

SVIATLANA IVANOVNA BYSTROVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

VOGAIS:

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR:

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

COORIENTADOR:

Dr. Carsten Dammert

Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: SVIATLANA IVANOVNA BYSTROVA

Título da Tese ou Dissertação: MEDIÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL EM VACAS HOLSTEIN-FRÍSIAS RECÉM-PARIDAS E SUA PONTUAL UTILIZAÇÃO NA PRÁTICA CLÍNICA

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 23-10-2019

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☐ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 23 de outubro de 2019

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao longo da realização deste trabalho, foram vários os apoios e ajudas dos que fiquei devedora, não sendo fácil encontrar palavras que comportem o sentimento de gratidão com aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. João Nestor Chagas e Silva expresso o meu profundo agradecimento, orientador neste trabalho, pela grande disponibilidade, pela dedicação incondicional que depositou na minha formação, pela amizade, por todo o trabalho de orientação e pelo apoio em todo o processo de construção e correção desta dissertação, pela compreensão e extraordinária paciência com que me presenteou ao longo de todo o processo.

Ao Dr. Carsten Dammert, com quem tive o privilégio de aprender ao longo do meu estágio, o meu sincero obrigado por me ter proporcionado a oportunidade de efetuar este estudo, pela disponibilidade demonstrada em orientar o meu estágio curricular, pela partilha dos conhecimentos práticos, pelas valiosas sugestões, críticas, pela inovação dos comentários, pelos preciosos ensinamentos que me concedeu, pela ajuda na correção do trabalho com sugestões úteis e apreciações críticas que o permitiram enriquecer e desenvolver.

Ao Professor Dr. George Stilwell pelo entusiasmo com o tema do estágio, pela disponibilidade e esclarecimento de dúvidas, pela partilha dos seus preciosos conhecimentos práticos e pelo apoio.

Ao Professor Dr. Miguel Saraiva Lima pelos valiosos conselhos práticos, pela motivação e sempre boa disposição, pela amizade e pelo apoio ao longo do estágio.

Ao Professor Dr. Ricardo Bexiga pela disponibilidade, apoio, conselhos e sugestões ao longo da realização do estágio curricular.

Ao Prof. Telmo Nunes pela preciosa ajuda e apoio na parte estatística do ensaio.

Ao produtor Sr. António Barão pelo apoio imprescindível, por todas as condições que contribuíram para que o estágio fosse o mais profícuo e agradável possível, pelo apoio financeiro no ensaio, por me ter mostrado que uma boa relação com as pessoas que nos acompanham no trabalho permite um melhor desempenho na nossa profissão.

Ao Eng.^o Ricardo Basílio e às Eng.^{as} Paula Silva e Rita Gromicho pelo acompanhamento, pela amizade, paciência e boa disposição durante todo o trabalho realizado na exploração Barão e Barão.

Agradeço com particular reconhecimento e sem exceção, a todos os meus colegas e amigos por todos os momentos em conjunto e toda a disponibilidade e companheirismo.

Ao corpo docente do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária e a todos os clínicos do Hospital Veterinário da Universidade de Lisboa, pela dedicação, pela paciência e pelos conhecimentos que me transmitiram.

À minha família por todo apoio, toda compreensão e todos os sacrifícios. Tem sido a minha fonte de inspiração, de suporte e de força de vontade que tanto preenche a minha vida e que, nos momentos de hesitação, foram todos eles que me incentivaram na realização deste trabalho.

À minha filha Viktoriya pela ajuda com o português.

A todas pessoas que contribuíram, mesmo sem saber, para me tornar naquilo que sou hoje!

Resumo

MEDIÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL EM VACAS HOLSTEIN-FRÍSIAS RECÉM-PARIDAS E SUA PONTUAL UTILIZAÇÃO NA PRÁTICA CLÍNICA

Este ensaio insere-se numa metodologia de estudo de caso e a amostra inclui 106 fêmeas selecionadas entre as vacas Holstein-Frísias múltiparas. A recolha dos dados iniciou-se a seguir ao parto com a medição da concentração sanguínea da proteína total (PT). Posteriormente, no quinto dia após o parto, foi efetuada uma segunda medição da concentração sanguínea da PT. As vacas leiteiras foram seguidas até 30 dias após o parto e incorporadas nos grupos sem e com doença pós-parto, “paratuberculose +” sem e com sintomas da doença pós-parto. Foram consideradas as principais e mais frequentes doenças do pós-parto em vacas leiteiras múltiparas em regime intensivo de produção, como a retenção placentária, metrite, mastite e cetose. Procurou adotar-se uma metodologia semelhante de medição da PT sérica aos vitelos recém-nascidos a fim de se conseguir um diagnóstico precoce de doenças do pós-parto em vacas leiteiras múltiparas, através do uso do refratômetro.

No total das 106 vacas múltiparas 70 fêmeas não adoeceram (66%) e 36 animais adoeceram (34%) no pós-parto. A variação (VarO, g/dL) da PT medida pelo refratômetro ótico (PTo) e a variação (VarD, % de Brix) da PT medida pelo refratômetro digital (PTd) foram estatisticamente significativas entre os grupos sem e com doença pós-parto ($p < 0,05$), sendo que no grupo sem doença pós-parto a Var da PT sérica foi positiva e no grupo com doença pós-parto, a Var foi negativa. O decréscimo no valor da PT entre o dia do parto e o quinto dia pós-parto, sugere possivelmente um sinal de doença. Nos grupos “paratuberculose +” sem e com sintomas de doença pós-parto, a VarO (g/dL) da PTo e a VarD (% de Brix) da PTd não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Os dois tipos de refratômetros usados para medir a PT sérica apresentaram uma forte correlação entre si ($\rho=0,98$), sendo que ambas as ferramentas foram fiáveis para esse fim, quando usados em vacas leiteiras. Porém, sugere-se a realização de outros estudos, análogos, com um maior número de animais na amostra, sobretudo dentro do grupo de cada doença do pós-parto. Seria igualmente importante fazer as medições da PT sérica também nas vacas secas, antes do parto (cerca de três semanas e uma semana antes da data prevista do parto) de forma a poder verificar a diminuição ou não da PT sérica à medida que se aproxima o parto como uma possível consequência da imunossupressão presente neste período.

Palavras-chave: vaca leiteira, proteína total, imunossupressão periparto, refratômetro, doenças do pós-parto.

Abstract

MEASUREMENT OF TOTAL PROTEIN IN RECENTLY CALVING HOLSTEIN-FRIESIAN COWS AND THEIR POINT USE IN CLINICAL PRACTICE

The study is part of a case study methodology and the sample includes 106 females selected from the multiparous Holstein Friesian cows. Data collection began after calving by measuring total protein (PT) blood concentration. Subsequently, on the fifth day after calving, a second measurement of PT blood concentration was performed. Dairy cows were followed up to 30 days postpartum and incorporated into the groups without and with postpartum disease, "paratuberculosis +" no and with symptoms of postpartum disease. They were considered the major and more frequent postpartum diseases in multiparous cows in production intensively, such as retained placenta, metritis, mastitis and ketosis. An attempt was made to adopt a methodology for measuring serum PT in newborn calves for the early diagnosis of postpartum diseases in multiparous dairy cows.

In the total 106 multiparous cows 70 animals did not become ill (66%) and 36 animals became ill (34%). The variation (VarO, g / dL) of the total protein measured by the optical refractometer (PTo) and the variation (VarD,% of Brix) of the total pteoin measured by the digital refractometer (PTd) were statistically significant between groups without and with postpartum disease ($p < 0.05$) ($p < 0.05$), and in the group without postpartum disease the Var of serum PT was positive and negative in the group with postpartum disease. The decrease in the PT value between the day of calving and fifth day pospartum possibly indicates disease. In the "paratuberculosis +" group the VarO (g/dL) of PTo and the variation (VarD) of PTd were not statistically significant ($p > 0.05$). Both types of refractometers used to measure serum PT were strongly correlated ($\rho = 0.98$), and both tools were reliable for this purpose when used in dairy cows. However, other similar studies should be performed with a larger number of animals sampled, even within the group of each postpartum disease. It would also be important to measure serum PT in dry cows before calving (about three weeks and one week before the expected date of calving) in order to be able to check the decrease or not of serum PT as calving approaches as a possible consequence of immunosuppression present in this period.

Key words: dairy cow, total protein, peripartum immunosuppression, refractometer, postpartum disease.

Índice

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE.....	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE GRÁFICOS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
1. ATIVIDADES DIÁRIAS NA BARÃO & BARÃO	1
1.1. Plano de controlo reprodutivo e sanitário	1
1.2. Clínica e cirurgia.....	5
1.3. Outras atividades.....	7
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1. OS 90 DIAS VITAIS	8
2. PERÍODO DE TRANSIÇÃO, BCS, BEN, STRESS E ALGUNS DISTÚRBIOS DO PÓS-PARTO:	
CETOSE E HIPOCALCÉMIA.....	9
2.1 Período de transição	9
2.2 Balanço energético negativo (BEN)	12
2.3 Stress	13
2.4 Cetose	14
2.5 Hipocalcémia	16
3 IMUNOSSUPRESSÃO NAS VACAS NO PERIPARTO	17
4 DOENÇAS RELACIONADAS COM A IMUNOSSUPRESSÃO: RETENÇÃO PLACENTÁRIA,	
METRITE, MASTITE E PARATUBERCULOSE	19
4.1 Retenção placentária.....	20
4.2 Metrite.....	23
4.3 Mastite	25
4.3.1 Produção de leite e o estatuto imunitário	25
4.4 Paratuberculose bovina	26
5 SIGNIFICADO DA PT NOS VITELOS RECÉM-NASCIDOS	28
5.1 Monitorização da TIP nos vitelos recém-nascidos.....	28

5.2	Principais alterações nas medições da PT em vitelos	28
6	SIGNIFICADO DA PT NAS VACAS	29
6.1	Introdução	29
6.2	Proteína Total	30
6.3	Principais alterações nas medições da PT nas vacas	30
7	VARIAÇÃO DA PT AO LONGO DO CICLO PRODUTIVO DA VACA	35
PARTE II – ENSAIO EXPERIMENTAL		39
1.	INTRODUÇÃO	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1.	Descrição da exploração	40
2.2.	Animais do estudo	41
2.3.	Desenho experimental	41
2.3.1.	Avaliação da Condição Corporal (BCS)	43
2.3.2.	Diagnóstico de doenças do pós-parto	43
2.3.3.	Recolha de dados	44
2.3.4.	Análise estatística	44
3.	RESULTADOS	46
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	59
BIBLIOGRAFIA		61

Lista de Figuras

Figura 1 - Os 90 dias vitais e imunossupressão periparto (adaptado de Elanco Animal Health 2015).....	8
Figura 2 - Evolução do peso corporal, da ingestão de matéria seca (IMS) e da produção da vaca leiteira ao longo da lactação e no período seco (adaptado de Chamberlain & Wilkinson 1996).....	9
Figura 3 Atividade dos neutrófilos (Δ) e dos linfócitos (\bullet) no período periparto (adaptado de Goff and Horst 1997).	18
Figura 4 - Consequências da Imunossupressão e do balanço energético negativo (BEN) (adaptado de Elanco Animal Health 2015).....	19

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Plano de controlo reprodutivo e de principais doenças.	2
Tabela 2 - Atividades desenvolvidas por área de intervenção.	6
Tabela 3 - Índices reprodutivos correspondentes ao período do estágio e os seus valores de referência	40
Tabela 4 - Desenho experimental e eventos associados	42
Tabela 5 – Condição corporal (BCS) das vacas do ensaio.	46
Tabela 6 - Idade das vacas do ensaio.....	46
Tabela 7 - Nº de lactações das vacas do ensaio.....	46
Tabela 8 - Doenças consideradas até 30 dias pós-parto (dpp), no grupo com doença pós-parto (SIM).	47
Tabela 9 - Vacas que desenvolveram mais do que uma doença nos 30 dias pós-parto (dpp).	47
Tabela 10 – Proteína total medida pelo refratómetro ótico (PTo, g/dL) e proteína total medida pelo refratómetro digital (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia pós-parto (5 dpp).....	48

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Valores da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM)	48
Gráfico 2 - Valores da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM)..	49
Gráfico 3 - <i>Boxplot</i> dos valores da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).	49
Gráfico 4 – <i>Boxplot</i> da variação (VarO, g/dL) da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo) entre o dia de parto (0 dpp) e o quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).	50
Gráfico 5 - <i>Boxplot</i> dos valores da proteína total (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).	51
Gráfico 6 - <i>Boxplot</i> da variação (VarD, % de Brix) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) entre o dia de parto (0 dpp) e o quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).	51
Gráfico 7 - Correlação entre os valores de proteína total medida pelo refratômetro dgital (PTd, % de Brix) e proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp).	52
Gráfico 8 - <i>Boxplot</i> da variação (VarO, g/dL) da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo) e da variação (VarD, % de Brix) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) entre o dia de parto (0 dpp) e o quinto dia depois do parto (5dpp) das vacas “paratuberculose +” sem (NÃO) e com sintomas da doença pós-parto (SIM).	54

Lista de abreviaturas

A/G – Proporção de albumina/globulina

AGNE – Ácidos gordos não esterificados

AINE - Anti-inflamatórios não esteroides

BCS – Condição corporal (*Body Condition Scoring*)

BEN - Balanço Energético Negativo

BHB - Betahidroxibutirato

Ca - Cálcio

CC - Corpos cetónicos

DAE - Deslocamento de abomaso à esquerda

DJ - Doença de Johne (Paratuberculose)

IMS - Ingestão de Matéria Seca

dpp – Dias pós-parto

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GNRH - Gonadorelina

IBR - Rinotraqueíte Infeciosa Bovina

Ig - Imunoglobulina

IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Insulin-like Growth Factor-1)

IgG – Imunoglobulina G

IIM – Infecção Intramamária

IL-8 - Interleucina-8

MAP - *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MHC II - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (*major histocompatibility complex*)

MPO – Mieloperoxidase

MV – Médico veterinário

PI3 - Parainfluenza 3

PMN - Polimorfonuclear neutrófilo

PO – Via oral (*per os*)

PT – Proteína total

PTd – Proteína total medida pelo refratómetro digital (% de Brix)

PTo – Proteína total medida pelo refratómetro ótico de proteínas séricas (g/dL)

ROS – Espécies reactivas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

RP - Retenção Placentária

rpm – Rotações por minuto

Se – Sensibilidade

Sp - Especificidade

TG - Triglicerídeos

TIP - Transferência da imunidade passiva

TMR – *Total mixed ration*

TNF α - Fator de necrose tumoral α

VarD – Variação da proteína total medida pelo refratômetro digital

VarO – Variação da proteína total medida pelo refratômetro ótico

Relatório de estágio

O presente estágio curricular decorreu na Barão & Barão Lda. – Exploração Agro-Pecuária. É uma exploração leiteira de vacas e cabras em regime intensivo de produção, em Benavente, do dia 22 de julho de 2015 ao dia 8 de janeiro de 2016, com o horário de trabalho das 8h às 18h. Durante este período de tempo, foi feita a recolha de dados para o estudo, a participação em rotinas diárias da exploração, foram acompanhadas as atividades do médico veterinário (MV) assistente Dr. Carsten Dammert na sua prática clínica nas áreas de Reprodução Bovina e Clínica de Espécies Pecuárias.

O interesse pelo estágio em vacas de leite surge principalmente pelo gosto, amor e paixão pelos bovinos, muito antes de entrada para o curso de Medicina Veterinária em Portugal.

O caminho difícil, mas ao mesmo tempo desafiante que os produtores levarão daqui para a frente tem que fazer com que as suas explorações se tornem ainda mais eficientes, competitivas, viáveis e economicamente estáveis para resistir às variações dos preços do mercado, devido ao excesso de oferta de leite no cenário europeu e, salvaguardar a produção de leite em Portugal.

Cabe ao MV acompanhar e aconselhar o produtor ao longo deste percurso na tomada de decisões importantes, integrar-se na equipa profissional bem como trabalhar para o mesmo objetivo com todos os envolvidos no funcionamento da exploração.

1. Atividades diárias na Barão & Barão

Durante o tempo do estágio tive oportunidade de acompanhar, participar e auxiliar na execução de vários procedimentos no âmbito da produção, reprodução, nutrição e clínica de animais de produção. As atividades desenvolvidas tiveram como principal objetivo o domínio da atividade profissional do MV na gestão e manejo geral de uma exploração de vacas leiteiras em regime de produção intensiva, bem como a aquisição e aperfeiçoamento da prática na área de clínica e de reprodução bovina, no diagnóstico das principais enfermidades com impacto económico significativo com a posterior discussão dos respetivos casos clínicos com o MV assistente, tratamentos e medidas preventivas a aplicar.

Procurou identificar-se os problemas de saúde mais frequentes e perceber os principais métodos de ação contra os mesmos, acompanhar o manejo reprodutivo de forma a conhecer a casuística da patologia de foro reprodutivo juntamente com as possíveis soluções, recorrendo-se ao uso de hormonas visando o objetivo de ter o animal gestante o mais rápido possível e com o menor número possível de dias “abertos”.

1.1. Plano de controlo reprodutivo e sanitário

O estatuto sanitário da exploração é T3, B4, L4, ou seja, oficialmente indemne. A paratuberculose é endémica na exploração. Durante o meu estágio, o plano de controlo das

principais doenças era a vacinação contra os principais agentes de doenças respiratórias [Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI3), Diarreia Viral Bovina (BVD), Pneumonia por Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e Pasteurelose], gastrointestinais e toxinfecções (Clostridiose, *Escherichia coli*, Rotavirus, Coronavírus e Salmonelose)

Tabela 1 Plano de controlo das principais doenças.

Doença/ medidas aplicadas	Grupos/altura de aplicação		
	Vacas	Novilhas	Vitelos
IBR, BVD, BRSV, PI3 vacinação	6 em 6 meses	13 meses de idade	3 semanas de idade
			6 semanas de idade
BRSV, PI3	-	-	7 dias de idade (intranasal)
Pasteurelose vacinação	Secagem	2 meses antes do parto	7 dias de idade
	3 semanas antes do parto		28 dias de idade
Clostridiose vacinação	6 em 6 meses	12-13 meses de idade	3 semanas de idade
		3 semanas depois	6 semanas de idade
Salmonelose vacinação	Secagem	2 meses antes do parto	7 dias de idade
	3 semanas antes do parto		28 dias de idade
Clamidiose (oxitetraciclina de longa ação)	Secagem	2 meses antes do parto	—
Rota-, Coronavírus, E. coli vacinação	3 semanas antes do parto	2 meses antes do parto	—
		3 semanas antes do parto	
Mastite (antibiótico de longa ação intramamário+ selante)	Secagem	—	—
Vitaminas A, D3, E	Secagem		—
Cetose (Monensina) Novilhas a vacas com elevada BCS	3 semanas antes do parto		—
Hipocalcémia (cálcio <i>per os</i> e subcutaneamente)	Dia do parto	—	—

Legenda: IBR - Rinotraqueíte Infeciosa Bovina, PI3 - Parainfluenza, BVD - Diarreia Viral Bovina, BRSV - Pneumonia por Vírus Respiratório Sincicial Bovino, *E. coli* - *Escherichia coli*; BCS – Condição corporal (*Body Condition Scoring*).

É de salientar que a vacinação dos vitelos com três semanas de idade pode interferir com as Ig maternas transferidos pelo encolostramento, que neutralizam os antígenos da vacina antes do sistema imunitário dos vitelos ter tempo para montar sua própria resposta, diminuindo a eficácia da vacina aplicada. A apresentação dos antígenos diminui a imunidade de origem materna, ou seja, o nível das Ig circulante nos vitelos, que podem ser necessárias para o vitelo combater doenças, deixando assim os vitelos mais vulneráveis às doenças infecciosas. Existe sempre algum risco, no caso das vacinas vivas, de doença após a vacinação por se tratar de vacinas “mais agressivas”. Além disso, no caso da aplicação das vacinas multivalentes, existe sempre uma probabilidade de os vitelos não serem capazes de reponder contra diversos agentes ao mesmo tempo. Assim sendo, a resposta à vacinação contra uma série de vírus, na presença de imunidade de origem materna, fica longe do desejável (Stilwell 2012). Contudo, o produtor tomou a decisão de vacinação precoce de vitelos em conjunto com o MV assistente da exploração, apesar de haver o risco de interferência de Ac maternos, uma vez que a vacinação precoce abrange os vitelos com falha na transferência da imunidade passiva (TIP) conferindo-lhes uma proteção.

O controlo reprodutivo era efetuado todas as segundas-feiras, durante a manhã. O diagnóstico de gestação realiza-se a partir dos 30 dias e 42 dias após IA/cobrição nas vacas e novilhas respetivamente por ecografia e com futura confirmação por palpação transrectal a partir de 60, 90 e 180 dias. Em todas as novilhas diagnosticadas gestantes é colocado um ímã para a prevenção de reticuloperitonite traumática.

Na altura da secagem, todas as vacas levam o antibiótico de longa ação intramamário e um selante, juntamente com uma injeção de Vitaminas A, D₃, E. Para prevenir a clamidiose, que pode causar aborto nas últimas semanas de gestação, faz-se aplicação de oxitetraciclina LA por via intramamária nas vacas gestantes, cerca de 50 dias antes da data prevista do parto. Nas novilhas, aos 60 dias antes da data prevista do parto administra-se apenas as Vitaminas A, D₃ e E.

Às três semanas antes da data prevista do parto, os animais eram transferidos do parque das vacas secas para o parque pré-parto com cama de palha, sendo-lhes fornecida comida TMR (*total mixed ration*) das vacas em lactação. Todas as vacas e novilhas com elevada condição corporal (BCS) levam um dispositivo intraruminal de libertação contínua de monensina sódica, para reduzir a incidência da cetose. Assim, durante o período de transição, as vacas são observadas várias vezes ao dia para detetar alterações de comportamento. Adicionalmente, é efetuada uma medição semanal do pH urinário às vacas no parque pré-parto, como método de monitorização da ingestão de sais aniónicos nesse período e da avaliação da sua eficácia.

Depois do parto, os animais são levados para o parque pós-parto ou do colostro, onde ficam durante alguns dias sob vigilância apertada de forma a iniciarem bem o período

de lactação e onde seja possível detetar precocemente, as doenças do pós-parto. Todas as vacas múltiparas levam um bolo de cálcio (Ca) *per os*, juntamente com 250 mL de solução de Ca subcutaneamente, no dia de parto, repetindo-se o bolo de Ca *per os* no dia seguinte, para a prevenção da hipocalcémia. As vacas com os sintomas de hipocalcémia levam adicionalmente 250 ou 500 mL de solução de Ca, via endovenosa.

Dada a importância dos primeiros dias pós-parto, as vacas são avaliadas diariamente por técnicos formados pelo MV e, sistematicamente, pelo MV assistente da exploração. Todos os dias, no final da primeira ordenha do dia, efetuava-se o controlo das mastites das vacas recém-paridas do parque pós-parto. Eram recolhidas amostras de leite de vacas com novo diagnóstico de mastite, congeladas posteriormente e, enviadas para análise e deteção de agentes de mastites contagiosas e, por vezes, associado ao teste de sensibilidade aos antibióticos. As amostras que serão cultivadas são congeladas imediatamente após a sua recolha (mais de 48 horas após a recolha) (National Mastitis Council 2004). Seguidamente realizava-se o tratamento das mastites e o de vacas com outras situações clínicas.

Após a recolha do colostro, este é avaliado em termos da qualidade através da utilização do refratómetro digital com índice Brix, antes de ser administrado aos vitelos recém-nascidos ou ser congelado. Aproveita-se o colostro com qualidade acima de 22% de Brix, sendo pasteurizado antes de congelação ou administração aos vitelos. Utiliza-se o sistema de pasteurização e descongelamento “Coloquick”. A administração do colostro aos vitelos recém-nascidos faz-se através da intubação esofágica com maior brevidade possível após o nascimento, sendo uma tarefa de prioridade.

A avaliação das vacas no pós-parto ocorria entre os dias três a cinco, associada a um exame visual aquando da mudança do parque do colostro (Parque 1) para o parque de produção (Parque 9), nomeadamente, para deteção de retenção placentária e nova avaliação da BCS. Durante os primeiros 10 dias pós-parto (dpp) media-se a temperatura retal e, se fosse superior a 39,5°C, observavam-se as características físicas do corrimento vaginal para determinar a presença ou não de metrite e, as características físicas do úbere e do leite, para a deteção da mastite.

A partir de 30 dpp era avaliada a involução do útero por palpação rectal e, mais uma vez, as características físicas do corrimento vaginal, caso este esteja presente. Sempre que necessário, recorria-se à utilização do ecógrafo. No caso de deteção de metrite clínica era administrado o tratamento protocolado que incluía, Trimethoprim e Sulfadoxine ou Ceftiofure e, eventualmente, anti-inflamatório não esteróide. No caso de endometrite, o tratamento incluía a PGF_{2α} e, por vezes, uma suspensão intrauterina de Cefapirina.

No caso da deteção de mastite, administravam-se antibióticos intramamário e sistémico associado a um AINE (geralmente, Flunixin Meglumina) conforme o protocolo elaborado pelo MV assistente. No Parque 1, os animais ficam durante alguns dias sob

vigilância apertada, de forma a iniciarem bem o período de lactação e, de modo a detetar-se precocemente, as doenças do pós-parto.

Para além do plano profilático contra as principais doenças, foram realizadas análises clínicas e laboratoriais para monitorização do estado fisiológico das vacas e da qualidade dos alimentos (matéria-prima, TMR).

Mensalmente, uma empresa efetuava o corte profilático das úngulas e o tratamento dos problemas a esse nível (cerca de 50 vacas de cada vez), procurando-se em primeiro lugar, tratar as vacas claudicantes e, em segundo lugar, efetuar a correção profilática das úngulas nas vacas secas e recém-paridas que não tivessem sido sujeitas a tratamento, nos últimos seis meses.

1.2. Clínica e cirurgia

A grande maioria das vacas doentes era detetada por avaliação do seu registo produtivo, ou seja, as vacas que demonstravam quebras na sua produção de leite eram vistas e examinadas, posteriormente. Durante a estadia na exploração leiteira observaram-se vários casos clínicos, tais como, deslocamento de abomaso à esquerda (DAE), cetose, hipocalcémia, pneumonia, diarreia, indigestão vagal e jejunité hemorrágica. Ocorreram casos pontuais de distócia, resolvidas com a correção manual do feto no canal obstétrico e com recurso à tração mecânica com auxílio do extrator de vitelos.

Foram observadas cirurgias para resolução de deslocamento do abomaso à esquerda por abomasopexia com acesso pelo flanco esquerdo.

Foi acompanhado o controlo reprodutivo de vacas nas visitas semanais do MV assistente, tendo sido efetuados o diagnóstico e a confirmação de gestação (por ecógrafo ou palpação transretal) e sincronização deaios em vacas anéstricas ou repetidoras.

Nos vitelos foram observados casos de diarreia, timpanismo ruminal, pneumonia, onfalite, otite, queratoconjuntivite. Realizaram-se lavagens transtraqueais a dois vitelos com o intuito de determinar os agentes causadores de pneumonia e para efetuar um TSA. Detetou-se a presença de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e de *Mycoplasma bovis*. Foram também recolhidas amostras de sangue da veia jugular para determinar a qualidade do encolostramento e o sucesso da transferência da imunidade passiva (TIP), através da avaliação da PT sérica.

Determinados casos culminaram com a realização de eutanásia, particularmente, em casos de fraturas nos membros pélvicos e de animais em estado crónico de patologia. Em algumas destas situações e em casos de morte súbita, foram efetuadas necrópsias em que se observaram casos de úlcera do abomaso, jejunité hemorrágica, mastite tóxica, fratura dos membros pélvicos, fratura de cabeça do fémur, pneumonia aguda e crónica, atrofia e necrose muscular (Síndrome de vaca caída), entre outros.

No total, foram realizados 907 procedimentos na área de bovinos leiteiros.

Tabela 2 - Atividades desenvolvidas por área de intervenção.

Área de intervenção	Nº de casos		
	Novilhas	Vacas	Total
Reprodução			
Diagnóstico de gestação	11	42	53
— Ecografia	-	8	8
— Palpação rectal	11	34	45
Inseminação (simulação)		12	12
Indução do parto	1	2	3
Parto eutócico	21	46	67
Partos distócicos	12	11	23
— Apresentação posterior	1	3	4
— Flexão dos membros	3	4	7
— Flexão da cabeça	-	1	1
— Desproporção feto-materna	8	1	9
— Parto gemelar	-	2	2
Aborto	-	1	1
Nadomorto	2	1	3
Laceração vulvar	7	2	9
Metrite puerperal	7	12	19
Endometrite	-	6	6
Retenção placentária	3	5	8
Quisto ovário	-	5	5
Anestro pós-parto	5	7	12
Controlo do estro (GNRH+PGF _{2α} , Ovsynch)	3	5	8
Cirurgia	Vacas	Vitelos	Total
Deslocamento do abomaso à esquerda	3	-	3
Abcesso	2	4	6
Descorna	-	34	34
Resolução de fraturas	-	1	1
Podologia	Vacas	Vitelos	Total
Correção profilática das úngulas	5	-	5
Panarício interdigital	3	-	3
Úlcera da sola	2	-	2
Dermatite digital	6	-	6
Contratura de flexores	-	2	2
Artrite	-	2	2
Clínica	Vacas	Vitelos	Total
Mastite Clínica	12	-	12
Edema do úbere	2	-	2
Abcesso do úbere	1	-	1
Laceração de úbere	7	-	7
Indigestão	23	7	30
Diarreia	12	19	31
Timpanismo ruminal	2	3	5
Úlcera do abomaso	2	-	2

Área de intervenção	Nº de casos		
Suspeita de paratuberculose	4	-	4
Síndrome da vaca caída	5	-	5
Suspeita de lesão da coluna vertebral	2	-	2
Hipocalcémia	3	-	3
Cetose	9	-	9
Pneumonia	2	12	14
Queratoconjutivite infecciosa	6	6	12
Otite	2	3	5
Eutanásia	1	1	2
Sanidade e análises clínico-laboratoriais	Vacas	Vitelos	Total
Exame clínico	23	11	24
Colheita de amostras de leite/colostró	6	-	6
Recolha de sangue para análise bioquímica	240	-	240
Medição do pH do sangue	-	4	4
Medição da glicose do sangue	-	3	3
Medição do pH da urina	23	-	23
Recolha de sangue para pesquisa de paratuberculose	21	-	21
Desparasitação externa	54	-	54
Vacinações	24	21	45
Secagem das vacas	14	-	14
Colocação de dispositivos intraruminais de monensina	8	-	8
Necrópsias	Vacas	Vitelos	Total
Morte súbita (sem alterações)	-	1	1
Doença digestiva aguda	1	3	4
Doença digestiva crónica	-	2	2
Doença respiratória aguda	-	1	1
Doença respiratória crónica	-	2	2
Doença digestiva e respiratória	-	1	1
Suspeita de trauma de coluna vertebral	1	-	1
Atrofia e necrose muscular (Síndrome de vaca caída)	1	-	1
Nadomorto	-	1	1
Mastite aguda	1	-	1

1.3. Outras atividades

Também tive oportunidade de acompanhar as atividades desenvolvidas pelos engenheiros zootécnicos, tais como, inseminações artificiais, transporte e identificação de animais, entre outras. Muitas vezes foram realizadas atividades de manejo no vitelheiro, tais como, administração de leite e colostro, descorna, identificação de animais, desinfecções umbilicais e movimentações de animais para outros parques.

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Os 90 dias vitais

A “Elanco” (2015) desenvolveu um conceito “Os 90 dias vitais”, que correspondem ao período de tempo decorrido entre aproximadamente os dois meses antes do parto e o mês após o parto (Figura 1). Neste período, a vaca leiteira experimenta muitas alterações



físicas e metabólicas (Mulligan et al. 2006; Ingvarsen and Moyes 2013).

Figura 1 - Os 90 dias vitais e imunossupressão periparto (adaptado de Elanco Animal Health 2015).

Uma série de transições biológicas e fisiológicas são acompanhadas por grandes mudanças na ingestão de alimentos, nos perfis hormonais e apresentam grandes fluxos nas demandas e função hepáticas. O balanço energético e o proteico negativos, bem como a imunossupressão, conduzem frequentemente a uma multiplicidade de problemas metabólicos e infecciosos, incluindo a retenção placentária (RP), cetose, metrite, deslocamento de abomaso à esquerda (DAE) e mastite, entre outros (Overton and Elanco Animal Health 2014).

Às alterações hormonais e metabólicas experimentadas pela vaca antes do parto adicionam-se as mudanças na maneira como o sistema imunológico é capaz de lidar com as possíveis infecções desde o dia da secagem até ao final do primeiro mês pós-parto, onde dois elementos são especialmente críticos para a vaca superar de forma satisfatória este período e iniciar bem a lactação: o balanço energético e a imunossupressão periparto (Elanco Animal Health 2015).

Uma má gestão dos 90 dias vitais pode trazer, em consequência, as doenças do pós-parto e uma deterioração do bem-estar da vaca. Todas as vacas vão sofrer, em algum grau, de balanço energético negativo (BEN) (Grummer 1995) e de imunossupressão (Chamberlain and Wilkinson 1996), a possibilidade de que venham a ter problemas no pós-parto vai depender de dois aspetos: o grau do BEN e a capacidade de adaptação a esta situação (Figura 2).

Tipicamente, imunossupressão periparto ocorre na área de um declínio de 25 a 40% na função dos neutrófilos (imunidade inata) e na função dos linfócitos (imunidade adquirida) (Kehrli 1989a; 1989b), especialmente em vacas leiteiras (Detilleux et al. 1994). Doenças metabólicas, como hipocalcémia e cetose, agravam supressão imunológica, e geralmente

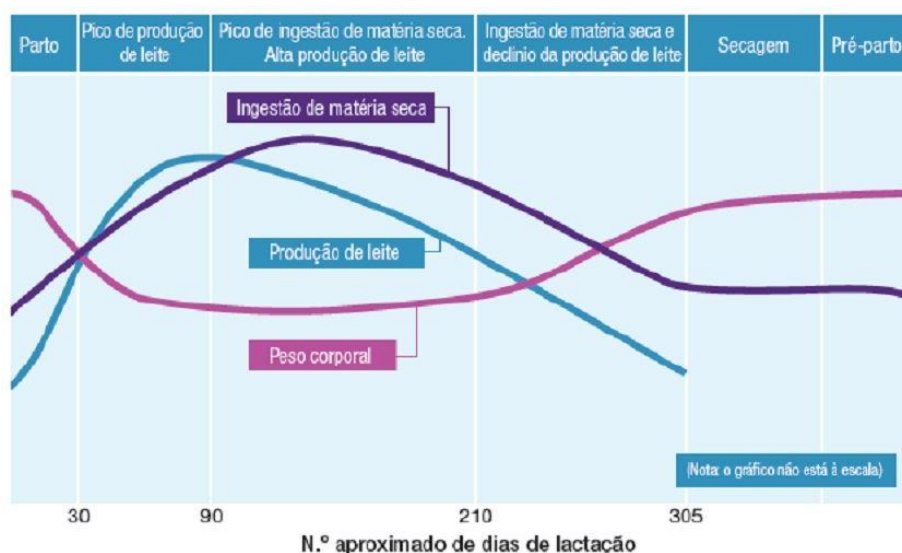


Figura 2 - Evolução do peso corporal, da ingestão de matéria seca (IMS) e da produção da vaca leiteira ao longo da lactação e no período seco (adaptado de Chamberlain & Wilkinson 1996).

resultam numa perda próxima de 60 a 80% da função imunológica. Vários distúrbios, como RP e metrite, podem ser manifestações de mal funcionamento do sistema imunológico. Balanço energético, proteico e/ou mineral negativos e fluxos hormonais associados ao início da lactação podem ser responsáveis pela imunossupressão observada em vacas leiteiras periparturientes (Goff 2008).

Os produtores são confrontados não só com os custos do tratamento de determinada(s) doença(s), mas também com as suas consequências a longo prazo (Mulligan et al. 2006). As perdas calculadas causadas por distúrbios puerperais e endometrite variam entre 160 a 420 € por caso (Opsomer and Kruif 2009). A cetose subclínica traduz-se por elevados prejuízos para o produtor, desde 250€ podendo chegar aos 600€ por vaca afetada (Esslemont 2012). As estimativas para as mastites clínicas rondam entre 69€ e 428€ por caso (Wolfová et al. 2006; Hagnestam-Nielsen and Østergaard 2009) e 102€ a 130€ por caso, para as mastites subclínicas (McInerney et al. 1992; Swinkels et al. 2005), sendo que o seu impacto nas explorações de leite ronda entre 26€ a 249€ por vaca, por ano (Aires 2005).

2. Período de transição, BCS, BEN, stress e alguns distúrbios do pós-parto: cetose e hipocalcémia

2.1 Período de transição

O período de transição é altamente importante para vacas leiteiras de alta produção (Holstein Friesian) (Atalay 2019) e inclui três semanas antes e depois do parto (Curtis et al. 1985). A mudança de um estado gestacional não lactante para um estado não gestacional lactante (Contreras and Sordillo 2011) acarreta problemas nutricionais e metabólicos (Campos et al. 2012; Atalay 2019). É um período crítico com um risco muito maior de

doença (Moreira et al. 2013), quando os riscos relacionados ao bem-estar animal são máximos (von Keyserlinkgk et al. 2009).

As adaptações metabólicas de animais periparturientes com foco específico nas mudanças de concentração de nutrientes/metabólitos são consideradas relevantes para a função imunológica, desempenham um papel fundamental e afetam a resposta imunológica de vacas em transição (Ingvarsen and Moyes 2013).

Durante o período de BEN ocorre o desfasamento do eixo somatotrópico, que origina queda nos níveis do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) na circulação sanguínea (Lucy 2008), afetando o sistema imunológico. IGF-1 é fundamental para o crescimento, diferenciação e funcionalidade de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), que foi demonstrado por estudos em humanos (Ibanez et al. 2005; Sohmiya et al. 2005) e em suínos (Kojima et al. 2008).

A ingestão de matéria seca (IMS) diminuída e níveis elevados de AGNE estão temporariamente associados à supressão da função imunológica no período periparto e podem contribuir para o comprometimento do sistema imunológico em vacas leiteiras (Rukkwamsuk et al. 1999).

Estudos mostraram que a gestação altera a funcionalidade das células imunológicas. De fato, pensa-se que a supressão imunológica é necessária por ser um mecanismo importante na manutenção da gestação e que a quebra da imunossupressão é um fator que pode estar envolvido em abortos espontâneos (Vince et al. 2001).

As concentrações de estradiol acima das fisiológicas foram relatados a suprimir a função de PMN (Klebanoff 1979). Antes do parto, as concentrações plasmáticas totais de estrogênio aumentam na vaca, pelo menos 10 vezes maior do que durante o estro (Comline et al. 1974), podendo estarem relacionadas com a imunossupressão e com as altas taxas de novas IIM antes do parto (Kehrli Jr. 2015). Além disso, descobriu-se que durante a gravidez normal nos humanos, a capacidade de ligação dos linfócitos à progesterona é aumentada (talvez como resultado do aumento dos níveis de estrogênio) e a concentração de progesterona no soro durante a gravidez combina-se como suficiente para reduzir as funções linfocitárias (Szekeres-Bartho et al. 1985). Provavelmente, as sensibilidades hormonais das células imunológicas durante o final da gestação possam ser alteradas e resultar em alterações funcionais devido ao aumento das concentrações de estrogênio. Durante os últimos dias de gestação em vacas são alcançadas as concentrações muito altas de estrogênio e de progesterona (Comline et al. 1974). Isso pode estar relacionado com o início da função linfocitária prejudicada na vaca no pré-parto, cuja capacidade de ligação hormonal aos linfócitos pode ser maior do que em vacas vazias.

A gestação afeta a capacidade funcional dos PMN. Os PMN estimulados de mulheres grávidas mostraram menor atividade respiratória (Crouch et al. 1995). Da mesma

forma, duas enzimas necessárias para a atividade respiratória dos PMN, mostraram estar localizadas em diferentes áreas subcelulares em mulheres grávidas e não grávidas (Kindzelskii et al. 2004; Kindzelskii et al. 2006). Essas alterações nas funções neutrofílicas indicam perturbação significativa das funções celulares dos PMN como resultado da gestação (Lippolis 2008).

A imunossupressão parece ser causada pelas alterações hormonais associadas ao parto. A progesterona possui a capacidade de inibir várias funções dos leucócitos (Clemens et al. 1979). Contudo, esta inibição é amplamente necessária para evitar a rejeição do feto "estranho" durante a gestação (Weinberg 1987). À medida que o parto se aproxima, as concentrações de progesterona no sangue diminuem e as de estrogênio permanecem altas ou aumentam (Grummer 1995). Os estrogênios têm um forte efeito supressor na imunidade mediada por células (Wyle and Kent 1977). Além disso, o estrogênio circulante elevado pode ser um fator que contribui para diminuir a IMS por volta do parto (Ingvarsen and Andersen 2000; Grummer et al. 2004), que pode diminuir de 10 a 30% (Friggens 2003). O cortisol é o estímulo fisiológico do trabalho de parto e normalmente aumenta 3 a 4 vezes no início do parto (Horst and Jorgensen, 1982), mas também é um potente imunossupressor (Burton et al. 2005).

A haptoglobina liberta-se dos hepatócitos em resposta a lesão ou a infecção tecidual (Murata et al. 2004) e atua como um potente imunossupressor da função linfocitária (Sadzadeh et al. 2004). O parto provoca a libertação de haptoglobina, provavelmente em resposta aos danos teciduais decorrentes de passagem do feto pelo canal cervical e a expulsão dos anexos fetais, além de possível influência do cortisol e da prostaglandina aumentados nessa fase. Após o parto, demonstrou-se o aumento de haptoglobina, que correspondeu ao estímulo da contaminação bacteriana instalada no útero após o parto (Alsemgeest et al. 1993). O aumento de haptoglobina pode estar relacionado com os possíveis estímulos infecciosos, devido às variações nas populações bacterianas e no grau de infecção (Sheldon et al. 2001). Os seus valores aumentaram em vacas leiteiras durante o período pós-parto e foram associadas a um aumento da incidência de endometrite (Sheldon et al. 2001; Williams et al. 2005) ou de outros problemas inflamatórios (Dubuc et al. 2010). O grau de inflamação e as camadas envolvidas do útero podem ser um fator que influencia a concentração de haptoglobina (Smith et al. 1998).

Os requisitos de vitaminas e de minerais das vacas leiteiras parecem ser consideravelmente mais altos no período periparto (Goff and Horst 1996). Ao parto, as concentrações plasmáticas de vitamina A (retinol) e de vitamina E (alfa-tocoferol) foram encontradas diminuídas (Goff e Stabel 1990). Embora uma parte da perda sérica possa ser devida ao sequestro no colostro, também parecem ser consumidas a uma taxa mais alta no

parto, como resultado do aumento do stress imunológico e metabólico (Goff and Horst 1997).

As deficiências de energia, proteína, minerais ou vitaminas têm sido associadas ao aumento da suscetibilidade a doenças como resultado da função imunológica deprimida. O parto e o início da lactação impõem elevado stress metabólico à vaca leiteira, causando deficiências relativamente agudas dos fatores nutricionais necessários à manutenção do sistema imunológico. Em parte, devido ao fraco desenvolvimento do trato digestivo, é impossível que uma vaca leiteira de alta produção ingere alimento suficiente para atender às demandas lactacionais de energia e de proteína. Portanto, no início da lactação, as vacas leiteiras apresentam um balanço energético e proteico negativos, o que prejudica o sistema imunológico (Goff and Horst 1997). A severa deficiência de energia no início da lactação também pode causar a acumulação de corpos cetônicos (CC) no sangue, prejudicando ainda mais a função linfocitária (Franklin et al. 1991).

A função diminuída dos PMN por volta do parto está associada a deficiências nutricionais que ocorrem antes do parto (Hammon et al. 2006). A função das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e dos PMN diminui à medida que as vacas se aproximam do parto e não se recupera até 2 a 3 semanas após o parto (Kehrli et al. 1989 a, b). A ingestão de alimento no pós-parto não atinge o pico até às nove-treze semanas de lactação, sendo que a IMS na primeira semana pós-parto é cerca de 65% da IMS máxima (Kertz et al. 1991). Níveis elevados de betahidroxibutirato (BHB) e outros CC prejudicam funções importantes das células imológicas, com possíveis implicações para infecções sistêmicas pós-parto (Klucinski et al. 1988).

2.2 Balanço energético negativo (BEN)

Nos últimos 14 dias antes do parto a IMS diminuiu em cerca de 50%, alcançando o ponto mais baixo no dia antes do parto (Grummer et al. 2004). Após o parto, a IMS precisa de ser aumentada de quatro a seis vezes para atender às altas demandas de nutrientes da produção de leite (Roche et al. 2000). Enquanto a vaca não conseguir suprir todas as suas necessidades nutricionais com o que absorve através da dieta, encontra-se num estado conhecido por BEN (Drackley et al. 2005), que pode durar até quatro a oito semanas pós-parto (Roche et al. 2000).

O aumento nas concentrações de ácidos gordos não esterificados (AGNE) está associado com comprometimento da função de PMN (Kimura et al. 1999; Rukkwamsuk et al. 1999; Hammon et al. 2006). Kimura et al. (1999) demonstraram que vacas mastectomizadas tiveram PMN com maior expressão de L-selectina no pré-parto, com melhor capacidade bactericida e com maior contagem de leucócitos durante o periparto em comparação com vacas intactas. Hammon et al. (2006) demonstraram que a redução na IMS e o aumento nas concentrações de AGNE durante o periparto estão associados com a redução na atividade

de PMN e com a predisposição de vacas para metrite puerperal. Stevens et al. (2011) relataram uma menor fagocitose, quimiotaxia e diapedese dos PMN no sangue de vacas no início da lactação experimentando o BEN, do que nas vacas a meio de lactação. Desta forma, as alterações metabólicas associadas com BEN comprometem função imunológica e predis põem vacas às doenças infecciosas (metrite, endometrite, mastite) (Moreira et al. 2013).

A intensificação da supressão imunológica foi relacionadas com o BEN (Chamberlain and Wilkinson 1996) e com uma redução de 30% na IMS, no periparto (Chapinal et al. 2011).

Existe uma relação, demonstrada *in vitro*, entre os metabolitos individuais que caracterizam o grau do BEN (AGNE, BHB e glicose) e o desequilíbrio fisiológico na função imunológica. Perkins et al. (2001) observaram que o nível de expressão da proteína L-selectina e do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC I) nos PMN aumentou em novilhas submetidas a restrição alimentar, em comparação com as sobrealimentadas.

2.3 Stress

Vários fatores de stress podem afetar vacas leiteiras periparturientes de várias formas, aumentando o déficit entre a energia utilizada e a consumida aumentando o BEN (Moreira et al. 2013). A IMS pode ser diminuída (Kushibiki et al. 2003; Waldron et al. 2003), sendo que os nutrientes podem ser desviados das funções críticas do crescimento fetal, da lactogénese e da preparação de funções de suporte para a lactação para assegurar a resposta ao stress (Moberg 2000).

O início de uma resposta ao stress envolve a libertação de hormonas como cortisol, epinefrina e norepinefrina, sendo conhecida por ter um efeito grave no sistema imunológico (Kushibiki et al. 2003; Waldron et al. 2003; Lippolis 2008). Como resultado, as vacas podem tornar-se mais suscetíveis a doenças infecciosas (Hopster et al. 1998).

Várias células imunológicas, como PMN, células T e células dendríticas, são afetadas quando um animal está em stress, bem como a expressão de moléculas específicas (L-selectina) (Burton et al. 1995; Burton et al. 2005). Um dos efeitos moleculares mais bem estudados do stress no sistema imunológico é o efeito do cortisol na expressão da proteína L-selectina, que é expressa na superfície das células imunológicas, como os PMN, e é necessária para a transmigração da célula da corrente sanguínea para o tecido no local de uma infeção. O cortisol causa a perda da expressão de L-selectina nos PMN e, assim, a capacidade de migrar através do endotélio vascular. Essa perda de resposta de PMN está correlacionada com o aumento da suscetibilidade do animal à mastite (Burton et al. 1995).

As alterações metabólicas decorrentes do stress térmico afetam também o sistema imunológico de vacas em transição, demonstrando-se que as vacas que não foram

arrefecidas durante o pré-parto tiveram menor concentração de IgG durante o pré-parto e PMN com atividades fagocíticas e oxidativas comprometidas no pós-parto (Amaral et al. 2009). Há uma relação entre os níveis de haptoglobina e as diferentes condições climáticas (Giannetto et al. 2011)

2.4 Cetose

Além do papel das reservas de gordura corporal como um amortecedor contra as dificuldades nutricionais, o tecido adiposo tem várias outras funções e interações com outros sistemas fisiológicos, principalmente o sistema imunológico (Vernon and Houseknecht 2000).

A cetose é observada como resultado do BEN apresentado devido à diminuição da IMS e do apetite (Atalay 2019). Geralmente, ocorre entre os dias 8 e 60 do pós-parto (González et al. 2011).

É diagnosticada quando existem níveis elevados de CC no sangue, urina ou leite de uma vaca. A doença é sempre caracterizada por um declínio na glicemia (Goff 2008), pois a gliconeogénese fica prejudicada. O animal fica mais deprimido, reduz a ingestão de alimentos adicionalmente e a produção de leite (Goff and Horst 1997).

A ocorrência da cetose (clínica e subclínica) está diretamente dependente de fatores relacionados com o manejo nutricional e com a genética do animal (Uribe et al. 1995). No trabalho de McArt et al. (2012) o pico de incidência e de prevalência de cetose subclínica ocorreu aos cinco dias após o parto.

Existem muitos fatores que podem resultar no desenvolvimento desta patologia no início da lactação, como o tipo de dieta, erros alimentares no período de transição, obesidade, fatores ambientais (stress térmico), comportamento alimentar (poucas e grandes refeições) e genética. Qualquer doença no período periparto que resulte na redução da IMS irá promover o BEN e, conseqüentemente, aumenta o risco de vacas desenvolverem uma cetose (Stilwell 2013).

Os leucócitos de vacas com sintomas clínicos de cetose e com maior concentração de CC e de AGNE no sangue responderam com os níveis mais baixos de interferons alfa e gama (Kandefer-Szerszen et al. 1992). O aumento do triacilglicerol no fígado acima do normal foi paralelo a uma expressão reduzida de moléculas de superfície associadas à função dos PMN no sangue. Além disso, a citotoxicidade celular independente de Ac e dependente dos PMN no sangue foi reduzida. Os PMN também eram menos capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) após estimulação (Zerbe et al. 2000). A vaca com cetose quase não tem resistência a doenças infecciosas (Goff 2008).

De acordo com Gilbert et al. (2003) e Kaneene et al. (1997) as alterações periparturientes na função leucocitária provavelmente estão relacionadas com os mesmos eventos metabólicos e endócrinos associados ao parto, assim como alterações nas

concentrações séricas de AGNE. A extensão da alteração periparto nas concentrações de AGNE está direta ou indiretamente relacionada à extensão da redução periparturiente na função leucocitária. Contreras et al. (2010) indicaram que alterações na concentração e composição do plasma afetam diretamente a função dos leucócitos devido à alteração na composição da sua membrana celular ou alterando a comunicação interna dos leucócitos.

Hoeben et al. (1997) relataram que a exposição dos PMN a níveis elevados de BHB reduziu a explosão respiratória dos PMN, concluindo-se que o BHB pode, em parte, ser responsável pela maior suscetibilidade a infecções locais e sistêmicas durante o período pós-parto. Mesmo as concentrações de BHB correspondentes à cetose subclínica também reduziram a atividade de explosão respiratória dos PMN. Devido a esse efeito inibitório, o nível sanguíneo elevado de BHB após o parto em vacas de alta produção pode ser, em parte, responsável pela maior suscetibilidade a infecções locais e sistêmicas durante o período pós-parto e durante a cetose subclínica e clínica (Klucinski et al. 1988; Hoeben et al. 1997).

O nível plasmático elevado de BHB e de outros CC em vacas leiteiras periparturientes tem sido associado a uma suscetibilidade aumentada desses animais a doenças infecciosas, como mastite e metrite (Paape et al. 1994). A função neutrofílica prejudicada durante o período periparto parece ser responsável pelo aumento da incidência dessas doenças infecciosas (Kremer et al. 1993).

Em vacas leiteiras as elevadas concentrações de AGNE causam menores concentrações de IgG, possivelmente, por alterações no conteúdo de lípidos no sangue durante períodos de mobilização lipídica. As elevadas concentrações de AGNE, bem como de BHB, correlacionam-se negativamente com as concentrações diminuídas de IgG (Tóthova et al. 2014). Mosch (2011) demonstrou que elevadas concentrações de AGNE no terceiro dia de lactação foram associadas com concentrações diminuídas de IgG. Melendez et al. (2009) mostraram que vacas com elevada BCS ao parto tiveram maiores concentrações de AGNE e menores concentrações de IgM. Lacetera et al. (2004) encontraram em novilhas secreção de IgM por PBMC de bovinos inibida na presença de diferentes concentrações de AGNE. A imunossupressão modulada por AGNE também foi demonstrada em ovelhas (Lacetera et al. 2002).

Em medicina humana, demonstrou-se que altas concentrações de AGNE estão ligadas a doenças metabólicas e inflamatórias, induzem inflamação e afetam a função imunológica (Hansson 2005; Zhang et al. 2006; Yaqoob and Calder 2007). Em bovinos, os aumentos no conteúdo lipídico no sangue e as concentrações séricas mais altas de AGNE têm sido associados a um aumento da incidência de doenças periparto (RP, DAE) e predispõem vacas leiteiras a doenças de base inflamatória (mastite, metrite, claudicação) (Dyk et al. 1995; Sordillo et al. 2009). Em medicina veterinária, a fisiopatologia complexa das

alterações nos lipídios no sangue e como estes afetam a imunidade das vacas leiteiras durante o período de transição ainda não está completamente esclarecida. Estudos que lidam com a evolução da associação entre as concentrações séricas de AGNE em vacas após o parto e as alterações no metabolismo proteico são bastante escassos (Tóthová et al. 2014).

Existe uma forte relação entre as concentrações de AGNE e de BHB e, as variáveis relacionadas com o metabolismo das proteínas logo após o parto, fato que poderá significar que as alterações metabólicas associadas ao desequilíbrio energético e à mobilização de gordura, podem estar relacionadas com as alterações no metabolismo das proteínas e na função imunológica. As concentrações de AGNE correlacionaram-se negativamente com os valores de PT, de albumina e de IgG, sendo que as vacas com maiores concentrações de AGNE apresentaram menores valores de PT séricas, de albumina e de IgG que as vacas com concentrações séricas de AGNE mais baixas ($< 0,35$ mmol/L). No entanto, o efeito da perda da BCS, do período seco até próximo do parto, sobre os diversos parâmetros metabólicos não se encontra totalmente esclarecido (Tóthová et al. 2014).

2.5 Hipocalcémia

É uma doença metabólica que afeta geralmente vacas leiteiras de alta produção e possui alguns efeitos generalizados que aumentam o risco de outras doenças metabólicas (Spain and Scheer 2002). Vacas hipocalcémicas são mais suscetíveis a doenças infecciosas e têm uma vida mais curta no efetivo leiteiro (Duffield et al. 2005).

Durante o período periparto, as necessidades por cálcio (Ca) aumentam, principalmente no início da lactação, o que resulta na diminuição do Ca intracelular (Kimura et al. 2006). A maioria das vacas desenvolveu algum grau de hipocalcémia no parto (Horst et al. 1994). A hipocalcémia subclínica acompanha a maioria dos partos (Goff and Horst 1997).

A hipocalcemia é associada ao distúrbio do sistema imunológico (Lippolis 2008), pois prejudica diretamente a resposta das células imunológicas a um estímulo ativador como bactérias, por afetar a quantidade de Ca armazenado no interior das células imunológicas bovinas (Kimura et al. 2006; Goff 2008). Uma fraca resposta de Ca intracelular teria um efeito significativo na capacidade funcional das células do sistema imunológico (Lippolis 2008).

O Ca regula a proliferação celular, a produção de citocinas e a expressão do receptor de citocinas, além de outras funções. A sinalização intracelular de Ca é um elemento crítico para a ativação e funções das células imunológicas (Carruthers et al. 2000). O Ca intracelular liberto em resposta ao sinal de ativação diminuiu à medida que a demanda de Ca para lactação se torna mais intensa. Suponha-se que as reservas intracelulares de Ca estão a ser utilizados para ajudar a sustentar o Ca extracelular, quando a vaca está a tentar

manter a homeostase do Ca (durante a formação do colostro na glândula mamária), sendo que a capacidade de manter as reservas de Ca necessárias no interior da célula fica comprometida (Kimura et al. 2006).

As reservas intracelulares de Ca nas PBMC diminuíram no parto e retornaram aos níveis normais à medida que o Ca do sangue das vacas retornou aos níveis normais. O estado extracelular do Ca afeta as reservas celulares de Ca em PBMC. A imunossupressão periparto em vacas leiteiras é devida, em parte, à capacidade reduzida das PBMC de montar um fluxo forte de Ca em resposta a um sinal, que normalmente ativaria totalmente essas células (Kimura et al. 2006).

As vacas com hipocalcemia tiveram baixas reservas de Ca intracelular. Quando uma célula imunitária, como um linfócito, encontra um antígeno bacteriano na sua superfície, desencadeia a liberação de Ca dentro da célula. Esse aumento intracelular do Ca inicia o processo pelo qual o linfócito produzirá Ac, péptidos bacterianos, etc., para eliminar as bactérias (Kimura et al. 2006). O grau desse aumento inicial no Ca após um sinal de ativação é um indicador da função e da capacidade de resposta das células imunitárias (Baus et al. 1996).

Além disso, a hipocalcemia atua como o fator de stress para vaca (Goff 2008). Os baixos níveis de Ca originam uma elevação da produção de cortisol, chegando a ser 10 a 15 vezes superiores à concentração plasmática pré-parto em vacas com hipocalcemia (Horst and Jorgensen, 1982). O cortisol é um poderoso agente imunossupressor e provavelmente exacerba a supressão imunológica normalmente observada no período periparto (Goff 2008), diminuindo a capacidade de resposta à invasão bacteriana (Spain and Scheer 2002). Distócia, partos gemelares, excessiva BCS e movimento para novo parque logo antes do parto são outros fatores que contribuem para níveis excessivos de cortisol no parto (Goff 2008). Assim, pode-se agravar ainda mais a imunossupressão normalmente presente no parto (Goff and Horst 1997).

3 Imunossupressão nas vacas no periparto

Quando ocorre uma diminuição função imunológica, diz-se que o animal está imunossuprimido e, por isso, muito mais suscetível às doenças (Kehrli Jr. 2015). O período periparto é o momento em que as alterações fisiológicas complexas ocorrem simultaneamente, tendo um efeito significativo na saúde do animal (Lippolis 2008).

Constatou-se que a maioria das mastites clínicas em vacas leiteiras ocorria no início da lactação, e que a maioria era causada principalmente por agentes patogênicos oportunistas (Kehrli Jr. 2015). Por sua vez, as infecções oportunistas estão associadas a comprometimentos graves dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Elanco Animal Health 2015). A imunidade contra doenças infecciosas das vacas é mediada por diversos mecanismos celulares e humorais, ainda que interdependentes (Kehrli Jr. 2015). A

desregulação imunológica periparturiente afeta a probabilidade de ocorrência de doenças infecciosas em praticamente qualquer sistema orgânico da vaca (Kehrli Jr. 2015) e pode aumentar a vulnerabilidade das vacas às doenças comuns do período de transição, como a mastite, a metrite ou a RP (Figura 4) (Elanco Animal Health 2015).

Durante o período periparto, as mudanças neuroendócrinas são responsáveis por fluxos hormonais, que podem afetar adversamente a função das células imunológicas. O sistema imunológico bovino é menos capaz de combater os agentes patogênicos (Hoeben et al. 2000; Pellan-Mattocks et al. 2000; Mehrzad et al. 2001). A vaca periparturiente revela uma competência imunológica diminuída, manifestando uma capacidade reduzida de quase todos os tipos de células imunitárias (Kehrli Jr. 2015). Há fortes evidências de disfunção imunológica de linfócitos e de PMN em vacas no período periparto (Kimura et al. 2002a; Kimura et al. 2002b, Mehrzad et al. 2002; Monfardini et al. 2002; Nonnecke et al. 2003, Sordillo et al. 2005; Lippolis et al. 2006; Burvenich et al. 2007).

A imunossupressão está mais marcada na altura do parto, sendo que começa cerca de 1 a 2 semanas antes do parto e dura até 2 a 4 semanas após o parto. Várias funções imunológicas mostraram a ser inibidas (Kehrli Jr. 2015). A imunossupressão no pós-parto pode chegar a um decréscimo de 25% a 40% na função dos PMN (imunidade inata) e dos linfócitos (imunidade adquirida) (Figura 3) (Goff 2008).

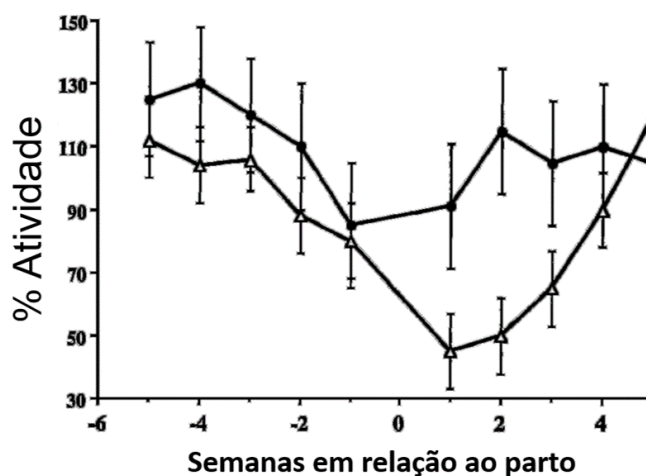
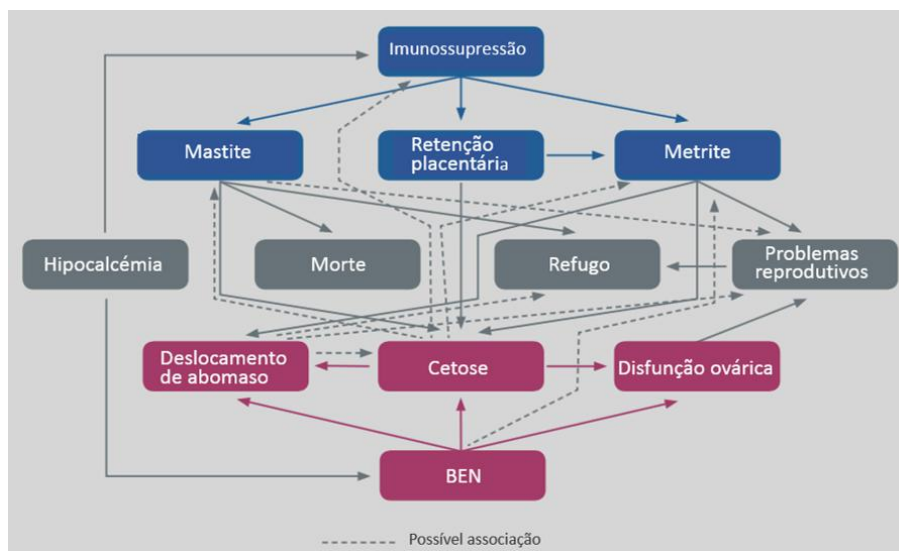


Figura 3 Atividade dos neutrófilos (Δ) e linfócitos (●) no período periparto (adaptado de Goff and Horst 1997).

A depressão do sistema imunológico deve-se a múltiplos fatores, sujeitos a alterações durante o período de transição, entre outros, como gestação, parto, metabolismo do Ca, início da lactação e ingestão de alimentos, BEN, AGNE, glucocorticoides que afetam a capacidade do sistema imunológico da vaca de combater efetivamente infecções (Mulligan and Doherty 2008).



Legenda: BEN – Balanço energético negativo

Figura 4 - Consequências da Imunossupressão e do BEN (adaptado de Elanco Animal Health 2015).

Os eventos fisiológicos decorridos no período de transição têm um efeito profundo no sistema imunológico (Lippolis 2008). Contudo, os fatores fisiológicos específicos que contribuem para a imunossupressão periparto e o aumento da incidência de doença clínica não foram totalmente elucidados. A supressão marcada de função imunológica ocorre na primeira ou segunda semana após o parto (Kehrli Jr. 2015). Relatou-se uma ampla variação nas atividades funcionais de leucócitos entre as vacas leiteiras e entre os diferentes estádios de produção (por exemplo, na época do parto) (Gunnink 1984a, b, c; Nagahata et al. 1992; Gilbert et al. 1993; Ishikawa et al. 1994). Mais importante ainda, foram relatadas associações entre a disfunção neutrofílica e os distúrbios periparturientes em vacas (Cai et al. 1994; Kelm et al. 1997; Kimura et al. 2002b). Defeitos na função linfocitária também contribuem para a supressão imunológica durante o período periparto. Além da produção reduzida de Ac, verificou-se a produção reduzida de citocinas que ativam e direcionam a imunidade inata e adquirida (Ishikawa et al. 1994; Detilleux et al. 1995).

4 Doenças relacionadas com a imunossupressão: retenção placentária, metrite, mastite e paratuberculose

Os animais imunocomprometidos são mais suscetíveis às doenças (Figura 4). As funções celulares imunológicas prejudicadas contribuem para novas infecções que levam a doenças, como mastite e metrite (Oliver and Sordillo, 1988). Alguns distúrbios uterinos estão associados ao comprometimento da função dos PMN e ao BEN, que começa antes do parto e se estende até o início da lactação (Hammon et al. 2006).

No passado, as vacas de alta produção leiteira eram bastante eficazes no combate à contaminação puerperal. No entanto, ao longo do tempo, têm vindo a apresentar um aumento na incidência total das doenças uterinas no período pós-parto, como a RP ou a

metrite aguda (Opsomer and Kruif 2009). A intensificação do manejo das vacas leiteiras e da seleção genética para o aumento da produção de leite, provavelmente, continuarão a resultar em fatores imunológicos adicionais de stress, que poderão conduzir a problemas aumentados associados à RP, à mastite ou à metrite (Sordillo 2005).

4.1 Retenção placentária

É provocada pela falha da separação entre os cotilédones (vilosidades da placenta fetal) e as carúnculas uterinas (criptas maternas) (Martelli and Junior 2014), que ocorre durante o terceiro estágio do trabalho de parto (parto anexial). É uma complicação relativamente comum nos ruminantes, principalmente nas vacas leiteiras (Divers and Peek 2008).

A RP raramente é considerada como uma afeção isolada (Manspeaker 1998) e, na maioria dos casos, deve ser considerada como um sintoma clínico de uma doença generalizada: doenças infecciosas, metabólicas, deficiências nutricionais ou outras desordens. São responsáveis por alterações metabólicas e neuro-endócrinas que interferem com os mecanismos de separação e libertação dos anexos fetais, favorecendo a RP (Wiltbank 2008). No entanto, os dados são contraditórios e nenhum fator endócrino e nutricional isolado fornece uma explicação satisfatória para o motivo pelo qual as vacas desenvolvem a PR (Kimura et al. 2002).

As membranas fetais devem ser expulsas em menos de oito horas após um parto natural (Hafez, 2004), portanto, considera-se anormal uma expulsão que ultrapassa oito a doze horas e uma RP quando a expulsão não ocorreu dentro de 24h após o parto (Martelli and Junior 2014). Segundo Kimura et al. (2002a), para que a placenta seja expulsa, é necessário que a componente fetal seja identificada como um “tecido estranho” ao organismo e rejeitada pelo sistema imunológico materno. Sabe-se, no entanto, que antes do parto, os linfócitos podem não ser sensíveis aos antigénios da placenta que impedem o aborto do feto (Jiang and Vacchio, 1998; Rogers et al., 1998).

Durante o periparto e na presença de um défice de imunidade, a proliferação dos leucócitos (especialmente, linfócitos e PMN) está diminuída, bem como a capacidade de fagocitose dos PMN, a atividade citotóxica dos linfócitos e a produção da interleucina-8 (IL-8). Devido a estas alterações, a resposta imunológica materna e a expulsão das membranas fetais estão prejudicadas, podendo resultar em RP (Mordak and Anthony 2015).

Os cotilédones das vacas com RP tinham menos quimioatratante leucocitário do que os cotilédones das vacas que expulsaram a placenta normalmente após o parto (Gunnink 1984; Hewieser and Grunert 1987). Os leucócitos obtidos de vacas que desenvolveram RP eram menos capazes de reconhecer o tecido dos cotilédones. A menor atividade quimiotática dos leucócitos foi observada antes do parto, ao parto e após o parto (Gunnink 1984a, b, c). Houve uma baixa infiltração leucocitária nos cotilédones de vacas com RP (Gunnink 1984;

Ehlert 1985; Heuweiser and Grunert 1987). Verificou-se uma redução de PMN nos casos de RP e elevadas quantidades de PMN no útero no parto normal (Gunnink 1984). A RP é uma doença associada à imunossupressão e foi correlacionada com uma diminuição da função dos PMN (Ruiz et al. 2016).

Há uma relação entre a supressão da função dos PMN durante o período periparto e a RP em vacas leiteiras (Gunnink 1984; Kimura et al. 2002), sendo que é a função neutrofílica determina se a vaca desenvolverá ou não a RP (Goff 2008). Os PMN de vacas com RP tiveram diminuição da capacidade de migração (Gunnink 1984) e da atividade de mieloperoxidase (Kimura et al. 2002), sendo que essa menor função foi observada antes do parto e que durou 1 a 2 semanas depois do parto (Goff 2008). A função neutrofílica prejudicada causa RP. As vacas com RP possuem menores concentrações IL-8, um dos quimioatraentes presentes no cotilédone no parto, podendo ser um fator que afeta a função de PMN em vacas que desenvolvem RP. Esse sistema imunológico suprimido também pode explicar por que as mesmas vacas são mais suscetíveis à mastite (Goff 2008).

Os PMN de vacas com RP tiveram uma resposta reduzida a quimioatraentes e a capacidade de fagocitose reduzida durante o período de duas semanas antes e duas semanas após o parto. Uma perda generalizada da função dos PMN antes do parto coloca uma vaca em risco de desenvolver PR (Romaniukowa 1984). Foi demonstrada uma associação entre a menor função dos PMN (atividade quimiotática e da mieloperoxidase) e a RP (Cai et al. 1994). A função neutrofílica reduzida é, provavelmente, a causa da PR. Um dos quimioatraentes nas cotilédones que atrai os PMN é a IL-8. Vacas que desenvolverão RP tiveram menos IL-8 no plasma antes do parto (Kimura et al. 2002).

Houve alguma associação entre o desenvolvimento de RP e a incidência de mastite (Emanuelson et al. 1993; Peeler et al. 1994). A ocorrência de mastite no puerpério precoce de vacas foi associada à RP (Lescourret et al. 1995; Gonçalves and Kozicki 1997). Gunnink (1984) sugeriu que os dois distúrbios provavelmente estão ligados porque ambos são causados pela supressão imunológica nas vacas afetadas. O desenvolvimento de mastite em vacas com RP demonstrou a relação com o sistema imunológico, em virtude da imunodepressão periférica do animal (Schukken et al. 1989).

Nas vacas com RP observaram-se complicações, nomeadamente mastite aguda ($\approx 63\%$), demonstrando a sua suscetibilidade em consequência da imunossupressão periférica, associada à resposta imunodeficiente do aparelho mamário. Os níveis de Ig demonstraram a incapacidade das vacas com RP de produzir IgM, IgG sanguíneas e a IgA no colostro e leite. Vacas com RP apresentaram concentrações séricas inferiores de IgA (1ª globulina produzida após ataque ao organismo, epitélio e mucosas) e de IgG (2ª Ig produzida ante as agressões ao organismo) no soro sanguíneo, demonstrando baixa capacidade de produzir Ac. A IgA é produzida por linfócitos e é fundamental em conjunto

com PMN e fagócitos para a defesa do epitélio e mucosas (Roitt 1991). Nas vacas com RP houve decréscimo de IgG e IgM nas taxas sanguíneas e níveis mais elevados destas Ig nas secreções de colostro e leite, evidenciando doença da glândula mamária. No colostro houve concentrações mais elevadas de IgM e IgG, e menores de IgA. O quadro evidenciou a presença de mastite aguda, antes do aparecimento de leucócitos (Gonçalves and Kozicki 1997).

As vacas com RP apresentaram níveis mais baixos de Ig no colostro, sugerindo-se que a RP poderia causar uma redução na capacidade dos linfócitos de produzir Ig (Lona and Romero 2001). Segundo Field et al. (1989), níveis de IgG inferiores a 1500 mg/dL no colostro representam falha da TIP para o vitelo, porque é Ig que existe em maior quantidade. Sugere-se que vitelos de partos com RP, com ou sem mastite, recebem menor aporte de IgG do que os do parto sem RP. Vacas com RP transferem menor aporte de Ig aos vitelos, via colostro e leite, em consequência das baixas taxas sanguíneas de Ig e da mastite. Possivelmente essa falta de Ig no colostro seja mais uma prova de uma associação entre a função imunológica reduzida antes do parto e a suscetibilidade subsequente a RP (Kimura et al. 2002).

As vacas com RP apresentaram, no dia do parto, quadro de neutrofilia, eosinofilia, monocitose e linfocitose, revelando imunodepressão periférica, em comparação com as vacas sem RP. Demonstrou-se uma relação estreita entre a produção de Ig, número de leucócitos, RP, inflamação do útero e da glândula mamária, tornando possível a previsão de RP 15 dias antes do parto nas vacas leiteiras (Gonçalves and Kozicki 1997).

Nas vacas sem RP a relação sérica A/G diminuiu, evidenciando o predomínio das globulinas. Esse fato revela aumento produtivo de globulinas e consequentemente de Ac nas vacas sem RP. Vacas sem RP possuíam elevadas concentrações de γ -globulinas, sugerindo maior capacidade de reação orgânica, e de 25,0% a mais de linfócitos. Nas vacas com RP a reação A/G foi inversa: antes do parto a relação mantinha-se nos padrões fisiológicos ($\approx 0,80$), elevou-se no dia de parto e declinou no terceiro dia pós-parto, sendo que no quinto dia pós-parto assemelhou-se à das vacas sem RP, reagindo à metrite e mastite. A relação A/G no soro foi maior nas vacas com RP, sendo maior que 1,0 (Gonçalves and Kozicki 1997).

A RP interfere no proteinograma de vacas leiteiras (Saut et al. 2014), sendo que os valores da albumina foram inferiores na primeira semana pós-parto nas fêmeas com RP e com corrimentos genitais (Souza et al. 2010; Saut et al. 2014). No entanto, não houve influência da RP na PT sérica, sendo que os valores de PT em vacas com RP estavam dentro dos padrões fisiológicos. As vacas com RP apresentaram um quadro de normoproteinemia com hipoalbuminemia (Saut et al. 2014). Gonçalves e Kozicki (1997)

observaram um gasto excessivo de proteínas até o quinto dia pós-parto, em vacas leiteiras com RP.

Vacas com RP apresentaram valores mais elevados da PT, sendo que nas vacas sem RP os perfis de albumina sérica foram mais elevados (Chassagn and Barnouin 1992). No estudo do Gonçalves e Kozicki (1997) a PT também foi mais elevada em vacas com RP, evidenciando-se no puerpério de vacas com RP um excessivo gasto de proteínas no terceiro e quinto dia pós-parto, reduzindo os níveis fisiológicos de PT.

Relatou-se a importância da albumina no estudo de RP, tal como a de ligar-se ao Ca, transportar hormonas e ácidos gordos polinsaturados (Chassagne and Barnouin 1992). As taxas elevadas de albumina em vacas com RP, associadas à deficiência de Ca e ao desequilíbrio de ácidos gordos polinsaturados na dieta do pré-parto, revelaram problemas na cascata do ácido araquidónico e na produção de Ac. Foi demonstrada maior proporção de albumina nas vacas com RP, relacionada à menor taxa de globulina (Gonçalves and Kozicki 1997).

Vacas com resposta inflamatória elevada durante o período pós-parto tiveram concentrações séricas reduzidas de albumina (Bossaert et al. 2012; Trevisi et al. 2012). Burke et al. (2010) relataram em vacas diagnosticadas com endometrite durante o início da lactação concentrações diminuídas de albumina plasmática e uma menor proporção de A/G.

4.2 Metrite

Os distúrbios metabólicos que ocorrem antes do parto predispõem as vacas para distúrbios de saúde uterina mais tarde (Hammon et al. 2006). Alguns distúrbios da saúde uterina estão associados ao comprometimento da função dos PMN e do BEN. A função dos PMN encontra-se prejudicada e está associada a deficiências nutricionais que ocorrem ainda antes do parto (Hammon and Goff 2006). Os PMN desempenham um papel importante, pois fornecem a primeira linha de defesa celular contra a colonização bacteriana no útero (Hammon et al. 2006).

No período pós-parto verifica-se, inevitavelmente, uma contaminação bacteriana do lúmen uterino que persiste até às primeiras duas semanas. Até 40% das vacas apresentam metrite nas primeiras duas semanas após o parto (Sheldon and Dobson 2004). Na maioria dessas fêmeas, está resolvida durante as primeiras cinco semanas pós-parto, persistindo, contudo, em cerca de 10-17% dos casos (Sheldon et al. 2009; Dubuc 2011). A suscetibilidade à infecção parece estar associada à imunossupressão periparto e ao estado energético (Hammon et al. 2006).

Em vacas imunocomprometidas, as bactérias não são controladas e crescem em grande número no útero (Goff 2008). Os PMN de vacas com metrite são menos capazes de eliminar bactérias, sendo isso evidente já no dia do parto. As vacas com metrite tinham concentrações mais elevadas de AGNE no sangue, que começaram pelo menos 2 semanas

antes do parto, sugerindo que essas vacas estavam mobilizando gordura corporal mesmo antes do parto. Vacas que estavam desenvolvendo problemas uterinos de saúde comiam menos alimento e essa diferença no consumo existia pelo menos uma semana antes do parto (Hammon et al. 2006). Demonstrou-se que o comportamento alimentar antes do parto é um importante fator de risco para metrite, sendo que por cada redução de 10 minutos por dia no tempo gasto a comer na semana antes do parto o risco de desenvolver metrite duplica (Urton et al. 2005).

A atividade da mieloperoxidase e a redução do citocromo c dos PMN no sangue, duas medidas da capacidade de matar dos PMN, em vacas com saúde uterina normal geralmente diminuiu apenas ligeiramente na altura do parto. Em contraste, em vacas com metrite puerperal, diminuiu acentuadamente ainda antes do parto (Hammon et al. 2006).

Há uma relação entre a supressão da função dos PMN durante o período periparto e a metrite em vacas leiteiras. Há um declínio nos PMN circulantes após o parto em vacas com metrite (Cai et al. 1994). Nas vacas diagnosticadas com metrite puerperal, as funções dos PMN no sangue foram prejudicadas no período periparto, as vacas também apresentaram maiores concentrações de AGNE e menor IMS durante o período periparto e maiores concentrações de BHB durante o início da lactação. A função neutrofílica também foi prejudicada em vacas com BEN no período periparto, caracterizado por níveis elevados de AGNE no sangue e diminuição da IMS. A função dos PMN diminuída e o balanço energético foram associados a distúrbios da saúde uterina, sendo que as diminuições na função dos PMN e o balanço energético ocorreram antes do parto e antes da detecção do distúrbio uterino (Hammon et al. 2006). Os mecanismos responsáveis pelo comprometimento da função dos PMN em vacas leiteiras periparturientes são pouco compreendidos (Hammon et al. 2006). Os desafios metabólicos associados à gestação tardia e ao início da lactação podem ser responsáveis em parte pelo comprometimento da função dos PMN durante esse período (Kimura et al. 1999).

A infecção uterina no pós-parto atinge mais frequentemente as vacas leiteiras em comparação com as vacas de carne devido às maiores exigências metabólicas a que as primeiras estão sujeitas, que condicionam o BEN e, às elevadas concentrações plasmáticas de CC, ao estado de imunossupressão transitório e ao desenvolvimento de hipocalcemia (Sheldon et al. 2009).

Existe uma associação entre o estado energético antes do parto e o comprometimento da função dos PMN em vacas leiteiras periparturientes. A elevação dos AGNE e a supressão da IMS antes do parto foram associadas à atividade suprimida da mieloperoxidase dos PMN durante o período periparto. A atividade da mieloperoxidase dos PMN no sangue e a concentração plasmática de AGNE nos dias ao redor do parto foram negativamente correlacionadas, sugerindo que as vacas que apresentam BEN antes ou ao

redor do parto estão predispostas à supressão imunológica periparturiente. A atividade da mieloperoxidase dos PMN foi geralmente mais gravemente afetada por insultos periparturientes (Hammon et al. 2006).

A função neutrofílica do sangue periférico de vacas leiteiras periparturientes é prejudicada em relação às vacas não-parturientes (Cai et al. 1994). As funções dos PMN bovinos começam a declinar 3-5 semanas antes do parto, atingindo um ponto mais baixo entre o parto e uma semana após o parto, e retornam lentamente aos níveis pré-parto de 2 a 4 semanas pós-parto (Detilleux et al. 1995; Politis em 1996). Os fatores associados ao comprometimento dos PMN na altura do parto são ainda amplamente desconhecidos (Hammon et al. 2006).

4.3 Mastite

Trata-se de uma reação inflamatória da glândula mamária independentemente da sua causa. Contudo, está quase sempre associada à presença de microrganismos patogénicos. É caracterizada por uma série de alterações físicas e químicas no leite e alterações patológicas no tecido glandular (NMC 1998).

Quase 25% de todas as mastites clínicas ocorrem durante as primeiras 2 semanas após o parto, principalmente por bactérias coliformes e estreptococos (que não sejam *Streptococcus agalactiae*). As taxas de novas IIM causadas por agentes patogénicos ambientais são mais altas durante as duas primeiras e as duas últimas semanas do período seco das vacas leiteiras (Hogan et al. 1989). A maioria das infecções por coliformes e estreptococos ambientais estabelecidas no período seco e que estão presentes no parto resultam em mastite clínica logo após o parto (Smith et al. 1985a).

A grande variabilidade nos sinais clínicos da mastite por *E. coli* imediatamente após o parto parece ser devida à diferença na suscetibilidade de diferentes animais (Hill et al. 1979). Especialmente, a taxa de diapedese dos PMN no úbere e a capacidade de geração de espécies reativas do oxigénio (ROS) dos PMN parecem ser importantes na determinação da gravidade da mastite por *E. coli* após o parto (Heyneman et al. 1990). Os PMN não apenas desempenham um papel central na patogénese da mastite aguda por *E. coli* em vacas periparturientes, mas também na remoção da placenta (Hoedemaker et al. 1992).

Kremer et al. (1993) mostraram que, após a indução experimental de mastite por *E. coli*, as vacas cetósicas ficaram mais gravemente afetadas do que os animais sem cetose.

4.3.1 Produção de leite e o estatuto imunitário

As principais alterações hormonais e metabólicas que preparam a glândula mamária para a lactação ocorrem durante as três semanas anteriores ao parto. A função de linfócitos e de PMN pode ser afetada por aumentos pré-parto de estrogénio, prolactina, hormona do crescimento e/ou insulina (Akers 1985; Houdebine et al. 1985).

Balanços energéticos, proteico e/ou mineral negativos e fluxos hormonais, associados ao início da lactação, podem ser responsáveis pela imunossupressão observada em vacas leiteiras periparturientes, nomeadamente a função neutrofílica prejudicada e, portanto, são responsáveis por uma parte da imunossupressão periparturiente observada (Kehrli Jr. 2015).

A capacidade dos PMN de eliminar os microrganismos (atividade de MPO) durante o período periparto em vacas multíparas mastectomizadas ou intactas, diminuiu igualmente nos dois grupos, ainda antes do parto (Kimura et al. 2002b). No entanto, tendo havido uma recuperação rápida da atividade de MPO dos PMN em vacas mastectomizadas, o mesmo não se verificou nas vacas intactas, até os 20 dias pós-parto (dpp). A produção *in vitro* de IFN- γ por linfócitos de vacas intactas diminuiu no parto, mas não significativamente nas vacas mastectomizadas. Para as vacas intactas, todas as populações de subgrupos de células T (CD3, CD4, CD8 e células positivas γ - δ) diminuíram no momento do parto. Essas mudanças populacionais mostraram, anteriormente, estarem associadas à imunossupressão comumente observada nas vacas periparturientes. Porém, a mastectomia eliminou essas alterações nos subgrupos de leucócitos (Kimura et al. 2002b).

Estes resultados sugerem que a glândula mamária pode produzir substâncias que afetam diretamente as populações de células imunológicas ou então, que as demandas metabólicas associadas ao início da lactação afetam negativamente a composição e o funcionamento das populações de PBMC. Está claro que a vaca intacta mobiliza uma maior quantidade de gordura corporal do que a vaca mastectomizada, sugerindo um BEN severo no início da lactação (Goff 2008).

4.4 Paratuberculose bovina

A Paratuberculose [doença de Johne (DJ)] é uma doença debilitante crónica dos ruminantes (Jones 2001), sendo nas explorações leiteiras é uma das doenças mais comuns (Rossi et al. 2017). Pode levar à redução da produção de leite, a um menor bem-estar animal e mesmo à morte (Kirkeby et al. 2017). Traz grandes perdas económicas como resultado da redução da produção, do abate dos animais infetados, dos custos com os testes laboratoriais e com as medidas de controlo (Jones 2001). Foi relatada de forma consensual em quase todos os países do mundo (Garry et al. 1999; VS, 2008).

Há estirpes do *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que preferem um determinado hospedeiro, como ovelhas ou vacas (Pavlik et al. 1999).

A contaminação fecal dos alimentos e da água é a principal fonte de transmissão, contudo a infeção de vitelos, antes do parto, também é possível. Além disso, as bactérias podem ser eliminadas diretamente no leite e no colostro de vacas infetadas, mesmo sem contaminação fecal (Whittington et al. 2017). Os vitelos com menos de 6 meses são os mais

vulneráveis às infeções (Garry et al. 1999). Os reservatórios silváticos contribuem igualmente para a contaminação ambiental (Beard et al. 1999).

O MAP pode colonizar os animais por anos, sem causar doença. A inflamação crónica do intestino pode surgir após um longo período de latência, particularmente quando os animais estão em stress. O microrganismo reside nos macrófagos da lâmina própria do intestino delgado e nos gânglios linfáticos associados, desenvolvendo uma inflamação granulomatosa e uma enteropatia que, em muitos casos, é fatal (Whittington et al. 2017). Os nódulos linfáticos regionais, o fígado e os pulmões, também podem estar envolvidos (Gurjav et al. 2015).

O avanço para o estágio clínico está associado à uma importante progressão da infeção granulomatosa no intestino delgado (Clarke 1997). A progressão da DJ assintomática para a clínica está associada a uma diminuição da imunidade mediada por células periféricas e ao aumento da produção de Ac (Stabel and Robbe-Austerman 2011). Os sinais clínicos incluem diarreia crónica que não responde ao tratamento, indigestão, excessiva perda de peso apesar de apetite normal e diminuição da produção de leite, embora esses sinais não sejam específicos da DJ. Os animais doentes não recusam a alimentação até que estejam gravemente doentes (Garry et al. 1999; VS 2008). Contudo, uma vez que a incubação do MAP pode ser demorada, os sinais clínicos podem não ser detectados no decurso da vida produtiva da vaca (VS 2008). Em situações de produção intensiva com um elevado nível de exposição de bovinos jovens ao microrganismo, a DJ clínica pode tornar-se comum em animais de um a três anos de idade. Com a propagação da DJ num efetivo, pode haver apenas um ou dois animais a revelar sinais clínicos da doença, de cada vez. Esses animais doentes podem, eventualmente, ser abatidos e a doença pode, então, passar despercebida, com uma disseminação de carácter crónico, por todo o efetivo (Garry et al. 1999).

A paratuberculose não tem cura [United States Department of Agriculture (USDA) 2005]. Além disso, há preocupações importantes sobre o bem-estar animal associado a esta doença crónica debilitante (Kirkeby et al. 2017), que ainda não está completamente compreendida (Garry et al. 1999).

Vazquez et al. (2014) confirmaram que a maioria das infeções por MAP era subclínica e que as características microbiológicas e patológicas da paratuberculose que levam à transmissão da doença não eram diferentes da tuberculose dos humanos. Tanto em humanos como nos animais, os indivíduos infetados disseminam as micobactérias patogénicas, silenciosamente, para novas áreas geográficas (Gurjav et al. 2015).

A DJ ganhou destaque nos últimos anos por causa da sua suposta ligação causal à doença de Crohn dos humanos (Davis and Masen-Bouterse 2012). Ambas doenças partilham uma patologia notavelmente semelhante e o MAP, juntamente com outros

microrganismos, foi identificado em alguns doentes com doença de Crohn (USDA 2005). Tem-se sugerido que a DJ pode estar implicada na patogénese da doença de Crohn, em humanos com alterações inflamatórias crónicas intestinais, podendo eventualmente, ser o agente etiológico da doença de Crohn (Bharathy et al. 2017).

5 Significado da PT nos vitelos recém-nascidos

5.1 Monitorização da TIP nos vitelos recém-nascidos

A monitorização da TIP a nível individual pode ser feita precocemente, como por exemplo a partir das 8 horas de idade, pois as Ig são absorvidas rapidamente após a ingestão (duas horas), indicando se, até ao momento, houve ou não ingestão e absorção adequada de Ig (Radostitis et al. 2000). A concentração máxima de Ig é atingida entre as 24 a 48 horas de vida, sendo este o período ideal para a avaliação da TIP (Feitosa et al. 2010).

A monitorização de uma TIP pode ser feita através de medição da concentração de IgG no soro do vitelo (testes diretos, ex. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou imunodifusão radial), ou de PT séricas (testes indiretos, ex. refratometria). O nível de concordância entre os resultados dos refratómetros e a determinação da concentração das IgG por radioimunodifusão é elevado (Elsohaby et al. 2015).

A refratometria tem sido usada há muitos anos (McBeath et al. 1971) e permite a tomada de decisões clínicas sem demora, uma vez que pode ser efetuada em condições de campo e fornece resultados rapidamente, sendo mais eficiente quando efetuado poucos dias após o nascimento (Thrall et al. 2004). É eficaz para avaliar a qualidade do colostro ou determinar a falha na TIP em vitelos, dado que as Ig são o principal constituinte da PT no sangue de vitelos, para além da albumina (McBeath et al. 1971).

Existem dois tipos de refratómetros: o ótico e o digital (Bartier et al. 2015). O primeiro é bastante preciso na medição do índice de luz refratada, o que está intimamente relacionado com a PT no sangue (Quigley et al. 2013). O segundo traz os resultados em % Brix e, quando utilizado em colostro, aproxima-se da percentagem de sólidos totais (Quigley et al. 2013).

A determinação da concentração da PT sérica com o refratómetro ótico de $\leq 5,0$ ou $\leq 5,2$ g/dL e com o refratómetro digital Brix de $< 7,8\%$ Brix, indicam uma falha na TIP, em vitelos leiteiros (Morrill et al. 2013). No entanto, Elsohaby et al. (2015) referiram mais recentemente, os valores limite para avaliar a falha na TIP em vitelos leiteiros, que foram de $< 5,5$ g/dL e $< 8,3\%$ Brix, respetivamente. Os dois refratómetros mostraram alta concordância entre si e coincidem na avaliação de vitelos com e sem falha na TIP (Elsohaby et al. 2015).

5.2 Principais alterações nas medições da PT em vitelos

O vitelo pode estar desidratado, o que pode elevar o valor real da PT e resultar na classificação de vitelos com falha de TIP, como vitelos que absorveram quantidades

adequadas de Ig. Muitas doenças, que afetam os vitelos desta idade, fazem-se acompanhar por desidratação (Thrall et al. 2004).

A relação entre a PT do soro e a IgG altera-se à medida que o vitelo cresce; a absorção de proteínas da dieta que não a IgG, o movimento da IgG do sangue para outros departamentos do corpo, a síntese de proteínas no fígado podem influenciar a precisão da medição. É melhor obter as medidas refratométricas em vitelos com mais de um dia de idade e menos de três dias de idade, esperando-se até que o vitelo tenha pelo menos 24 horas de vida para garantir a absorção completa da IgG, a partir do intestino (Quigley 2001).

No colostro normal, a relação entre a IgG e as outras proteínas que não Ig é razoavelmente constante. Assim, a relação entre as medidas do refratômetro e a TIP é satisfatória. No entanto, se a relação for alterada, por exemplo, usando suplementos de colostro, a precisão do refratômetro pode ser afetada (Quigley 2001).

6 Significado da PT nas vacas

6.1 Introdução

As enfermidades de caráter subclínico são a causa das maiores perdas económicas porque passam despercebidas. A sua precoce identificação é de particular importância, pois permitirá a correção rápida, por exemplo, de erros alimentares. O conhecimento de um certo número de parâmetros sanguíneos (soro e/ou plasma) para a determininação do perfil metabólico das vacas, pode servir não só como diagnóstico, mas também ajudar a determinar a natureza e a extensão da perturbação (Nejra et al. 2012).

O perfil metabólico ajuda na predição e no diagnóstico de doenças metabólicas, mas, no entanto, não substitui o exame físico e o histórico sanitário-produtivo do efetivo ou do animal. Contudo, o perfil metabólico, *per se*, pode ser limitado para diagnosticar problema específicos, pois as diferenças entre efetivos com ou sem problemas podem não variar significativamente (Gonzalez 1997).

Um critério para identificar efetivos com potenciais problemas pode ser quando pelo menos dois componentes do perfil metabólico estão fora do intervalo normal e/ou quando 20% ou mais dos animais de um efetivo têm mais de três componentes fora do normal (Adams et al. 1978).

A utilização do perfil metabólico ganhou importância nos últimos anos, sobretudo quanto às doenças do periparto de vacas leiteiras, com auxílio no diagnóstico, prognóstico e prevenção, para além de permitir o diagnóstico pré-sintomático de alterações metabólicas e a avaliação da condição nutricional do efetivo (Duffield et al. 2009; Chapinal et al. 2011).

Os componentes bioquímicos sanguíneos mais comumente determinados no perfil metabólico estão relacionados com as principais vias metabólicas do organismo como, por exemplo, as globulinas, a albumina e a PT, que definem o metabolismo proteico (Dirksen and Breitner 1993). A medição das proteínas séricas pode ser uma importante ferramenta

diagnóstica para a detecção, diagnóstico e monitorização de várias doenças e processos patológicos, incluindo doenças infecciosas e inflamatórias, distúrbios renais ou gastrointestinais, estados de imunodeficiência, bem como paraproteinémias causadas por neoplasia linfóide ou de células plasmáticas (Tothova et al. 2016).

A quantificação da concentração sérica da PT representa um passo básico na bioquímica geral e na rotina da clínica laboratorial prática (George 2001). Em geral, o índice da PT tem escasso valor para a avaliação do estado nutricional proteico. No entanto, pode ser um indicador do conteúdo de proteína na alimentação, apesar das alterações sanguíneas ocorrerem lentamente (Payne and Payne 1987).

6.2 Proteína Total

A PT sérica é composta por todas as proteínas do soro sanguíneo. A sua concentração depende do estado de equilíbrio entre a sua síntese e a decomposição. São sintetizadas principalmente pelo fígado, sendo que a sua taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal, especialmente com os níveis de proteína e de vitamina A e, com a funcionalidade hepática (Payne and Payne 1987; González and Scheffer 2003).

A maior fração da PT diz respeito à albumina e às globulinas, sendo que, nos bovinos, a sua proporção é quase igual ou ligeiramente maior em favor das globulinas (Swenson et al. 1993). São encontradas em concentrações que podem ser medidas em g/mL. Além destes constituintes principais, o soro sanguíneo também contém muitas outras proteínas em concentrações muito baixas (medidas em ng/mL ou pg/mL) e na bioquímica da clínica veterinária são relativamente pouco estudadas (Tothova et al. 2016).

A albumina é responsável por 35 a 50% da PT (Eckersall 2008), o resto é predominantemente formado por globulinas (α -1, α -2, β e γ) (Nejra et al. 2012). A albumina e a porção menor das globulinas (α e β) são sintetizadas no fígado, sendo que a principal exceção é a maior porção das globulinas (γ) (Nejra et al. 2012), que é produzida pelo sistema imunitário, nomeadamente pelo tecido reticuloendotelial, células linfóides e plasmáticas (Eckersall 2008). Demonstrou-se que os tecidos não hepáticos, incluindo o intestino, o pulmão, o tecido adiposo e a glândula mamária, também têm a capacidade de sintetizar algumas proteínas séricas, para funções muito específicas (Vreugdenhil et al. 1999).

6.3 Principais alterações nas medições da PT nas vacas

As concentrações da PT no soro são rigidamente controladas para o equilíbrio das suas funções fisiológicas em áreas da imunidade, coagulação, transporte de pequenas moléculas e inflamação. As alterações ligeiras ou mais acentuadas nas proteínas séricas, nomeadamente nas concentrações de albumina e globulinas, podem ser indicadoras de processos patológicos não específicos ou podem representar potenciais marcadores

diagnóstico de algumas condições patológicas (Tothova et al. 2016). Por outro lado, as variações no perfil e nas concentrações de proteínas séricas podem ocorrer também sob algumas condições fisiológicas (Weaver et al. 2000).

São os inúmeros fatores que podem causar variabilidade fisiológica dos valores da PT no soro sanguíneo dos bovinos como idade, perfil hormonal, gestação, lactação, estado nutricional, stress ou perda de líquidos (Jordan et al. 2006). As variações fisiológicas da PT estabelecem-se principalmente entre vacas gestantes e em épocas diferentes de lactação (Gonzalez 1997). Há também influência de fatores ligados à raça ou ao cruzamento de raças diferentes, ao sistema de criação – dieta e alimentação e ao clima (Birgel Jr. et al. 2003). O clima (estação do ano) e as mudanças na alimentação podem estar associadas com as variações no perfil metabólico, que podem aumentar o risco de transtornos metabólicos (Gonzalez 1997).

Uma correlação negativa entre o nível de albumina e a idade pode ser consequência da correlação positiva entre o nível de globulinas e a idade, vista a correlação existente entre albumina e globulinas (Gonzalez 1997). As globulinas aumentam com a idade, fato atribuído à maior “experiência” imunológica (Payne and Payne 1987), ao passo que o nível de albumina declina. Alguns autores assinalam que os animais mais velhos têm maiores teores de proteína sanguínea do que os mais novos, talvez por terem maior eficiência metabólica na utilização da proteína. A fração proteica responsável por este aumento parece ser as globulinas, principalmente da fração gama (Payne and Payne 1987). Segundo Campos et al. (2012), a albumina em animais saudáveis não mostra modificações significativas, uma vez que os seus valores são alterados apenas nos casos associados à sua síntese ou uso.

A maior proporção de concentrado/forragem fornecida durante a lactação geralmente está associada a níveis mais baixos de fibra e níveis mais altos de amido na dieta, o que gera um aumento na produção de ácido propiónico no rúmen e um aumento na oferta de proteínas microbianas (Heck et al. 2009). Isso reflete-se por um aumento da PT sérica durante a lactação e uma ligeira diminuição durante o período seco (Piccione et al. 2012).

Os requisitos nutricionais dos animais são fornecidos pela dieta, o tipo de proteína fornecida pode gerar alterações significativas no metabolismo do rúmen, o que pode afetar o valor sérico da PT (Kaneko et al., 1997). Em geral, baixos valores de PT podem mostrar um déficit relativo na entrada de proteína na dieta dos animais, o que reduz a disponibilidade de aminoácidos para a síntese da proteína microbiana. Baixa síntese de proteína bacteriana gera menores quantidades de precursores para a síntese de albumina no fígado (Campos et al. 2012).

Quando a ração é deficiente em proteínas, a diminuição da albumina persiste até dois-três meses, durante o período pós-parto. Contudo, as razões para as albuminas

diminuírem não são determinadas somente pela carência de proteínas na ração. Por isso, a interpretação das suas concentrações no perfil metabólico deve considerar, para além da alimentação, os aspetos de manejo, da saúde e do estado fisiológico dos animais (Piccione et al. 2012).

Burhans (2006) relatou que as vacas alimentadas com dietas com alta ou baixa proteína durante todo o período seco apresentaram as concentrações da PT semelhantes. O aumento da oferta de proteínas na dieta, começando no parto e continuando nos 150 dias pós-parto, aumentou as concentrações plasmáticas de PT e de albumina (Law et al. 2009). Além disso, Raggio et al. (2007) determinaram que a suplementação de quantidades crescentes de proteína metabolizável a vacas leiteiras em lactação aumentou as concentrações de albumina, mas não afetou as concentrações de PT.

Os fatores fisiológicos que podem gerar a variabilidade nos valores de PT em vacas leiteiras são a influência da gestação, do parto e do puerpério (D'Angelino et al. 1975; Fagliari et al. 1998; Feitosa and Birgel 2000). A variação dos teores séricos de PT e de suas frações durante a gestação é bem conhecida. A gestação, na sua fase final, determina variações significativas no quadro proteico de vacas (D'Angelino et al. 1975).

Durante o período periparto, há que ter em conta fatores como a desidratação, a alteração do volume plasmático e a função hepática das vacas. A gestação é acompanhada por um aumento substancial e progressivo do volume plasmático, seguido por uma diminuição 6 a 24 horas após o parto (Jansakul et al. 1989). Logo após o parto também ocorre um ajuste circulatório às necessidades hídricas e metabólicas como resultado do funcionamento da glândula mamária (efeito de diluição) (Ingraham and Kapple 1988).

A hipoglobulinemia em vitelos recém-nascidos que receberam encolostramento inadequado pode ser detetada mediante perfil metabólico, o que permite tomar precauções para evitar complicações devidas ao aumento da suscetibilidade a sofrer infeções. O estado hipoproteínico da vaca ao final da gestação é uma das causas do baixo nível de Ig no colostro, e isso também pode ser detetado pelo perfil metabólico da vaca antes do parto (Gonzalez 1997).

Os perfis metabólicos em vacas leiteiras no período pós-parto podem ser influenciados pelas condições climáticas. Existe uma influência da estação nos metabolitos sanguíneos durante o período pós-parto. A PT e a albumina estavam mais altas na primavera do que no verão e outono e mais baixas no verão. O aumento de PT e de albumina na primavera provavelmente está correlacionado com a vegetação disponível nesse período. Portanto, provavelmente as concentrações mais baixas de PT e de albumina no verão podem ser causadas por uma diminuição da ingestão de azoto pela alimentação (Alberghina et al. 2013).

A diminuição da PT sérica pode estar relacionada com falhas hepáticas (fígado gordo ou cirrose hepática), com os transtornos renais (síndrome nefrótica) e intestinais (síndrome de má absorção, enteropatia), com o parasitismo, com as hemorragias, com a idade do animal (animais jovens) ou por déficit alimentar de fontes proteicas (subnutrição) (Gonzalez 1997; González and Scheffer 2003; Eckersall 2008). O declínio da albumina tem sido relacionado à baixa ingestão de proteínas (Payne e Payne 1987). Calcula-se que as dietas com menos de 10% de proteína causam diminuição dos níveis proteicos no sangue (Eckersall 2008). Dietas com deficiência de proteína no início da lactação impedem a recuperação dos níveis sanguíneos protéicos no pós-parto (Gonzalez 1997).

Dado que o metabolismo das proteínas é difícil de avaliar com precisão, uma alternativa é determinar o consumo de proteínas com base nos níveis séricos de albumina (Campos et al. 2004). De fato, há uma relação direta entre a ingestão de proteínas e os níveis séricos de albumina em vacas. De modo geral, a albumina é um indicador a longo prazo do estado proteico, ou seja, os níveis sanguíneos de albumina são afetados pelo consumo de proteína bruta. Por outro lado, embora uma dieta baixa em proteínas causa diminuição dos níveis sanguíneos de albumina, a concentração de globulinas é pouco afetada por esta razão (Gonzalez 1997).

Em estados de debilitação, muita proteína de reserva, especialmente do músculo e do fígado, é degradada para servir de fonte de glicose, ao mesmo tempo que ocorre diminuição das PT no plasma provocando queda na osmolaridade plasmática, o que por sua vez resulta em saída de líquidos da corrente circulatória para os tecidos (edema) (Gonzalez 1997).

A infiltração lipídica no fígado também pode diminuir as concentrações de PT e de albumina (West 1990). A diminuição das concentrações de albumina resulta da redução da capacidade de síntese no fígado, devido a acumulação de gordura que este órgão sofre no início da lactação, uma vez que essa proteína é sintetizada no fígado (Payne e Payne 1987; Contreras et al. 2004). O processo do fígado gordo consequente de excessiva mobilização de lipídios é comum no início da lactação, devido ao desequilíbrio energético. A mobilização lipídica em resposta às necessidades energéticas da lactação é responsável por um grau variável de lesão hepática (Butler e Smith 1989). É comum observar lesões hepáticas, especialmente em vacas de alta produção e após 3 ou mais lactações (Sommer, 1975). Uma informação importante para avaliar a evolução da cetose é o nível de albumina e PT, entre os outros perfis metabólicos, que diminuem com a diminuição da função hepática (Gonzalez 1997).

É geralmente aceito que o nível de albumina está positivamente relacionado com o desempenho produtivo (Gonzalez 1997). Essa relação está fortemente associada à função hepática, necessária para a manutenção do equilíbrio homeostático e homeorético da

lactação (Bauman and Currie 1980). Vacas com melhor produção de leite apresentaram maiores valores de albumina (Gonzalez and Rocha 1998; Jones et al. 1982). Alguns autores (Pösö and Lindberg 1994) sustentam que a demanda de aminoácidos para a síntese de proteína no leite reduz a síntese de outras proteínas e, por isso, a concentração da albumina diminui na medida em que a lactação avança.

O aumento da PT sérica ocorre com a desidratação (hemoconcentração), com as infecções, com os tumores, com o estado de choque, nos animais velhos e, eventualmente, numa amostra hemolisada (González and Scheffer 2003).

A concentração de PT (albumina e globulinas) é utilizada como diagnóstico de patologias, como deficiência severa de proteínas, baixa nutrição, alterações metabólicas ou doenças hepáticas e renais, entre outras (Campos et al. 2007). As proteínas séricas têm sido frequentemente utilizadas para avaliar as infecções que podem ocorrer durante o período pós-parto (Mallard et al. 1998). A maioria desses problemas manifesta-se após o parto e, geralmente, estabelece-se já no final da lactação precedente ou no final do período de secagem (Polakova et al. 2010). As PT monitorizam a produção de Ac, possibilitando prever RP antes do aparecimento dos sinais clínicos (Gonçalves and Kozicki 1997).

O proteinograma tem sido utilizado na Clínica de Bovinos como auxílio para o diagnóstico das insuficiências hepáticas crônicas, sendo o quadro proteico caracterizado por uma hiperproteinemia associado a hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, estando a relação A/G diminuída ($< 0,5$). Demonstrou-se que as variações da relação A/G no puerpério recente estão próximas desse limiar, devendo este fato ser considerado no momento da interpretação da função hepática em vacas na fase do periparto (Birgel Jr. et al. 2003).

Altos níveis de globulinas estão associados a doenças infecciosas ou a vacinações recentes. Existe uma correlação negativa entre albumina e globulinas: um aumento nas globulinas, devido por exemplo a estados infecciosos, inibe a síntese de albumina no fígado como mecanismo compensatório para manter constante o nível proteico total e, portanto, a pressão osmótica sanguínea. Por outro lado, na disfunção hepática, o nível de albumina cai, mas o de globulina aumenta. As globulinas, portanto, são indicadores limitados do metabolismo proteico, tendo maior importância como indicadores de processos inflamatórios. Seus níveis aumentam com mastite e em infecções uterinas ou podais. Mudanças nos níveis das globulinas podem ser usadas para avaliar estados de adaptação ao stress: animais adaptados tendem a ter níveis normais, enquanto os não adaptados têm os níveis aumentados (Payne and Payne 1987).

Embora pareça que a PT sérica ou frações proteicas possam estar associadas a aspectos de saúde ao nível da vaca, não se sabe a sensibilidade e a especificidade de usá-las como marcadores oportunos no efetivo. Além disso, as respostas destes aos fatores dietéticos/alimentares ou de manejo não foram bem caracterizadas (Overton and Burhans

2013). Cozzi et al. (2011) relataram os componentes de variação significativa no efetivo para albumina, bem como, os efeitos do parto e do estágio de produção na PT e globulina. No geral, parece que as alterações nas frações plasmáticas das proteínas, particularmente a albumina, podem estar associadas à saúde em vacas. Além disso, a variação ao nível do efetivo sugere o potencial de avaliação deles como ferramentas de diagnóstico; no entanto, serão necessários grandes conjuntos de dados para avaliar a robustez dessas ferramentas para uso na avaliação ao nível do efetivo (Overton and Burhans 2013).

7 Variação da PT ao longo do ciclo produtivo da vaca

Nas vacas leiteiras saudáveis de elevada produção, há um efeito significativo dos diferentes estágios da gestação e da lactação sobre a PT, as γ -globulinas e a relação A/G. A vaca leiteira de alta produção revelando as modificações das PT séricas ocorridas durante as diferentes fases fisiológicas, nomeadamente do período seco até o parto e a lactação (os 90 dias vitais), estando a maioria delas relacionadas com a transição da gestação para a lactação (Piccione et al. 2012).

Dunlap e Dickson (1955) mostraram, ao trabalhar com ovinos, a influência da gestação sobre o proteinograma sérico, demonstrando que a partir do início da gestação ocorria a diminuição das taxas séricas de albumina, a partir da metade da gestação ocorria a diminuição dos níveis séricos de globulinas, com retorno da albumina aos níveis séricos normais no momento de parto.

D'Angelino et al. (1975) revelaram que durante a evolução da gestação de fêmeas bovinas Holstein ocorria uma diminuição dos níveis séricos da PT e da fração γ -globulina. Contudo, Aguggini e Nava (1958) não observaram variações acentuadas da PT durante a gestação. No terço final da gestação, observou-se a diminuição dos teores séricos da PT decorrente, principalmente, da redução dos valores da fração γ -globulina (Dunlap and Dickson 1955; D'Angelino et al. 1975; Birgel Jr. et al. 2003). A concentração de globulinas diminui semanas antes do parto, mas seus valores são recuperados em até três semanas após o parto (Gonzalez 1997). No final da gestação observou-se diminuição dos teores séricos de PT (Caballero and Vallenias 1958; Hamana and Usui 1972; D'Angelino et al. 1975), de globulinas totais e de fração γ -globulina (D'Angelino et al. 1975). A diminuição de globulina no soro no final da gestação também foi relatada por Rowlands et al. (1975) e Al-Mujalli 2008. A albumina apresentou aumento dos seus teores no final da gestação (Caballero and Vallenias 1958; Ross 1960; Hamana and Usui 1972; D'Angelino et al. 1975;). As variações da relação A/G estão ligadas com as modificações observadas nos teores destas frações proteicas. Notou-se aumento desta relação no final da gestação, período em que justamente se observou aumento da fração albumina e diminuição dos valores de globulina (D'Angelino et al. 1975).

As variações observadas nas globulinas foram de menor intensidade e sua diminuição foi constatada no final da gestação, correspondendo a uma queda principalmente da fração γ -globulina (Hamana and Usui 1972; D'Angelino et al. 1975). Contudo, Caballero e Vallenas (1958) observaram aumento das globulinas séricas no final da gestação. As modificações do proteinograma, nomeadamente as variações dos teores séricos das globulinas, (principalmente da fração γ -globulina) na fase final da gestação e no puerpério estão relacionadas com as modificações na produção e distribuição dos Ac maternos, possivelmente em virtude da transferência de Ac para a glândulamamária, durante a formação do colostro (D'Angelino et al. 1975; Mulei 1991; Birgel Jr. et al. 2003; Piccione et al. 2012). Baglioni et al. (1957) observaram que apenas aproximadamente 21% dos vitelos recém-nascidos apresentaram a fração γ -globulina no soro, número que sobe a aproximadamente 42% no final da primeira semana de vida, salientando que as vacas no final da gestação apresentam variação na relação das frações proteicas, de acordo com a presença ou ausência de γ -globulina no soro de vitelo ao nascimento.

Karsai e Schafer (1984) demonstraram em vacas leiteiras uma diminuição dos valores de albumina entre a 6ª e 4ª semana antes do parto. Uma semana antes do parto, o valor da albumina diminuiu em vacas leiteiras (57%), como da PT, enquanto o da globulina aumentou (Al-Mujalli 2008). Uma ligeira diminuição da PT durante a última semana de gestação também foi observada por Benysek et al. (1971). Observou-se uma diminuição média de cerca de 10% na concentração sérica de albumina em vacas leiteiras no parto ou próximo ao parto (Little 1974; Manston et al. 1975). No entanto, no estudo mais recente do Piccione et al (2011) as concentrações séricas de albumina foram relativamente estáveis durante o período periparto, aumentando ligeiramente no parto ou em torno do parto. As concentrações da PT diminuíram do período pré-parto até a primeira semana pós-parto, com diminuição das concentrações de globulinas, responsável pelo declínio nas concentrações da PT (Piccione et al. 2011). Segundo Gonzalez (1997), a queda na PT pode ser de 10 a 30% da concentração normal, recuperando-se logo depois do parto.

Feitosa and Birgel (2000) verificaram também a influência do parto sobre o proteinograma, os valores da PT e da albumina foram menores no parto, do que os registados no final da gestação e durante o puerpério. Segundo Fagliari et al. (1998), as alterações no proteinograma estão restritas ao momento do parto, pois no dia de parto os valores de PT, albumina e globulinas foram menores do que os observados durante a gestação e puerpério. Feitosa e Birgel (2000) verificaram no momento do parto os valores de PT e albumina menores do que os observados no final da gestação e durante o puerpério. Rowlands et al. (1977) encontraram, ao parto de algumas vacas, uma diminuição da albumina, mas não em todas, enquanto outros autores encontraram uma diminuição geral da albumina (Rowlands and Manston 1983; Grünberg et al. 2011). Estas diferenças

poderão ser reflexo de diferentes tempos de colheita das amostras no pós-parto ou de diferenças nos métodos usados para a dosagem de albumina. Os valores séricos da PT das vacas leiteiras com menos de 24 horas após o parto aumentaram gradualmente nos primeiros dias do puerpério (Fagliari et al. 1998; Feitosa and Birgel 2000; Saut et al. 2009). Mulei (1991) mencionou uma queda significativa dos níveis sanguíneos de albumina no parto. Segundo Gonzalez (1997), os níveis de albumina diminuem no parto e várias semanas após por diminuição na síntese hepática de proteínas, por diminuição no consumo devido ao stress ou por combinação dos fatores anteriores. A concentração de albumina pode cair após o parto, aumentando progressivamente durante o pós-parto, exceto em vacas com dietas baixas em proteína, nas quais a concentração pode continuar baixa por até 4-6 meses pós-parto.

Vários autores relataram valores mais baixos de albumina em vacas leiteiras após o parto (Fergusson and Chalupa 1989; Al-Mujalli 2008). Karsai e Schafer (1984) demonstraram uma diminuição dos valores de albumina entre o primeiro e quinto dia do puerpério. O quadro proteico no puerpério recente foi caracterizado por hipoalbuminemia, sendo que os valores médios obtidos foram menores aos observados em fêmeas não gestantes, no terço inicial e médio da gestação (Karsai and Schafer 1984; Birgel Jr. et al. 2003), mas que discordam parcialmente com D'Angelino et al. (1975) e com Feitosa e Birgel (2000). Em consequência à hipoalbuminemia, observou-se diminuição dos valores da relação A/G, sendo os valores mínimos obtidos no puerpério recente e, as diferenças com os valores observados em fêmeas não gestantes, no terço inicial e final da gestação foram significativas (Birgel Jr. et al. 2003). Segundo D'Angelino et al. (1975), no puerpério a albumina atingiu o nível observado em fêmeas não gestantes. A alteração do teor da albumina no pós-parto, foi irrelevante, sendo que a sua concentração foi semelhante ao longo dos "90 dias vitais", observando-se um pequeno aumento no parto, que pode ser devido à uma maior síntese de albumina pelo fígado ou a uma diminuição do volume plasmático, mascarado pela hipoglobulinemia (Piccione et al. 2012). No puerpério, D'Angelino et al. (1975) observaram normalidade dos valores de globulinas séricas, o que não se observou por Caballero e Vallenas (1958).

Contudo, no estudo de Piccione et al. (2012) o período pós-parto foi caracterizado por uma diminuição da PT devido à diminuição das γ -globulinas. Os baixos valores de PT nos primeiros dias após o parto devem-se, seguramente, à transferência de globulinas para a glândula mamária para a formação de colostro (Nath et al. 2005). O período pós-parto, comparado com as fases anteriores, foi caracterizado por uma diminuição da PT devido à diminuição das γ -globulinas e, por consequente aumento da relação A/G. A relação A/G revelou um aumento no pós-parto e no início da lactação, como resultado da diminuição das γ -globulinas devido à translocação das Ig para a glândula mamária (Piccione et al. 2012).

A PT continuou a diminuir na primeira semana de lactação e, a seguir, aumentou ligeiramente. A PT sérica aumentou durante a lactação se comparada com o final da gestação (Piccione et al. 2012). Com o estabelecimento da lactação e o arranque da produção leiteira, a PT aumenta (Souza et al. 2008). Os níveis das γ -globulinas aumentam a partir da quinta semana da lactação (Piccione et al. 2012). Essa diferença na PT pode ser explicada pela transição no processo de adaptação ao novo estado fisiológico do animal. Na medida em que a lactação progride, os requisitos diminuem e o animal pode atingir a homeostase (Ceballos et al. 2002). As variações de PT refletem as necessidades maternas das proteínas necessárias para ordenha e fornecer Ig (Bell et al. 2000; Roubies et al. 2006; Mohri et al. 2007). A concentração de PT foi relacionada positivamente com aumentos na produção de leite (Jones et al. 1982), bem como a concentração sanguínea de albumina (Rowlands et al. 1977). Vacas hipoalbuminêmicas não manifestaram todo seu potencial produtivo; algumas vacas até podem direcionar as reservas proteicas para manter a produção de leite às reservas de proteína corporal, porém se o balanço proteico negativo persistir por muito tempo, sofrerão de hipoalbuminemia e a produção de leite inevitavelmente cairá. Baixas concentrações de albumina estão associadas com baixa produção de leite não somente em quantidade, mas também em qualidade (Payne and Payne 1987).

As modificações do quadro proteico no puerpério deveriam ser consideradas como um reflexo, parcial ou integral, da influência da gestação e do parto no proteinograma, de modo que, com o evoluir do puerpério, os valores retornem aos patamares observados em animais não gestantes ou na primeira metade da gestação (Souza et al. 2008). Segundo Fagliari et al. (1998), este retorno ocorreria nos primeiros 15 dias, mas segundo Pösö et al. (1994) ele ocorre mais tarde, entre as três e as oito semanas, após o parto. No entanto, nenhuma pesquisa conseguiu elucidar, com exatidão, o período após o parto necessário para que esses valores retornem aos patamares observados na primeira metade da gestação ou no período pós-puerperal (Souza et al. 2008).

As concentrações mais elevadas da PT registradas nas vacas em lactação em relação as vacas secas, são devidas a globulinas. Por sua vez, as maiores concentrações de globulinas em vacas em lactação podem estar relacionadas com os processos inflamatórios, como as formas subclínicas de mastites ou de endometrites (González and Rocha 1998). Vacas leiteiras de elevada produção tiveram menores níveis de globulinas (Jones et al. 1982).

PARTE II – ENSAIO EXPERIMENTAL

1. Introdução

A transição da gestação para a lactação é um período de grande stress metabólico para as vacas leiteiras (Piccione et al. 2012). Durante esse período, a alta demanda de nutrientes e a redução transitória da IMS faz mobilizar a gordura corporal das vacas, o que pode resultar no desenvolvimento de doenças metabólicas (ex. complexo fígado gordo-cetose). O puerpério influencia a função hepática. As elevadas concentrações séricas de AGNE são prejudiciais para o metabolismo das proteínas e para a função imunitária e, durante esse período são detetadas concentrações diminuídas de PT sérica, de albumina (Souza et al. 2008) e de IgG (Sordillo et al. 2009; Tóthová et al. 2014).

Nas vacas, a PT sérica pode ser medida com o auxílio de um refratômetro. É uma ferramenta prática, simples e eficaz, amplamente utilizada por veterinários para determinar o estado geral de saúde dos vitelos (Quigley 2001). Numa exploração leiteira, serve geralmente para avaliar a qualidade do colostro ou determinar uma falha na TIP em vitelos após a administração do colostro (Morris et al. 2013). Existem dois tipos de refratômetros (o ótico e o digital) que, entre si, mostram uma elevada concordância nas suas medições (Elsohaby et al. 2015).

Devido a grave crise que se instalou no setor leiteiro tornou-se necessário apostar na prevenção das doenças. A determinação da concentração das proteínas séricas pode ser uma importante ferramenta diagnóstica para a deteção, o diagnóstico e a monitorização de várias doenças e processos patológicos ou estados de imunodeficiência (Tothova et al. 2016).

- **Objetivos**

Os objetivos do presente estudo foram: a medição da PT em vacas multíparas da raça Holstein- Frísia no dia do parto (0 dpp) e aos cinco dias após o parto (5 dpp), a determinação da variação da PT entre o dia do parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp), no grupo de animais sem doença pós-parto e com doença(s) pós-parto, a pesquisa de uma possível relação entre a variação da PT e a ocorrência das principais doenças do pós-parto, tais como RP, metrite, mastite ou cetose.

2. Material e métodos

2.1. Descrição da exploração

O estudo realizou-se entre 29 de agosto e 19 de dezembro de 2015, na Barão & Barão, Lda - Exploração Agro-Pecuária, localizada em Benavente (Latitude 38°56'13.3"N, Longitude 8°48'04.0"W), que possui um efetivo de cerca 1.000 cabeças de bovinos, com uma área total de 650 hectares dos quais 200 hectares são de regadio e que explora intensivamente vacas leiteiras de raça Holstein-Frísia, com a realização de duas ordenhas por dia, a cerca de 416 vacas em lactação. A média de produção ronda aos 35 kg/vaca/dia com uma média de 3,6% de gordura, 3,1% de proteína e aproximadamente 250.000 células somáticas/mL, com uma produção média de cerca de 11.200 litros de leite em 305 dias por vaca lactante. Por ano, ocorrem cerca de 500 partos, sendo que todas as fêmeas são recriadas na exploração. Os principais índices reprodutivos correspondentes ao período de tempo equivalente imediatamente antes (julho 2015) e depois do estágio (dezembro 2015) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Índices reprodutivos correspondentes ao período do estágio e os seus valores de referência

Índices reprodutivos	Julho 2015	Dezembro 2015	Recomendado (1)	Crítico (2)	Portugal (3)
Período voluntário de espera (dias)	50	50	40-60	-	45-60
Intervalo entre partos (dias)	398	402	365 – 415	>395	409,0 ± 68,8
Intervalo parto – 1ª IA (dias)	72	70	60 – 90	>70	95,4 ± 30
Intervalo parto – concepção (dias)	123	127	90 – 120	>120	-
Taxa de Gestação à 1ª IA (%)	30	29	30 – 60	<40	51,4 ± 8,1%
Número de doses de sémen por concepção	4,03	2,8	1,5 – 3	>3,0	1,43 ± 0,74
Taxa Detecção de Cio (%)	53,8	61,6	65-70%	-	38,1 ± 6,9%.
Taxa Fertilizaç. Global (%)	13,3	22	30	20	-
(1) – Costa (2011); (2) - Ribas (1997), citado por Rodrigues (2012); (3) - Rocha et al. (2002)					

A análise dos índices reprodutivos apresentados na tabela 3 permite concluir que apesar de taxa de gestação à 1ª IA não se alterou significativamente (30% em julho e 29% em dezembro), houve uma importante melhoria na detecção de cio (de 53,8% em julho para 61,6% em dezembro) e eficiência de inseminação, que se refletiu em número IA's por concepção (4,03 em julho e 2,8 em dezembro) aumentando a taxa de fertilização global de 13,3% em julho para 22% em dezembro. São múltiplos fatores que podem justificar a referida melhoria. Na exploração em questão, os resultados reprodutivos pioram todos os anos na altura do verão, sobretudo em julho e agosto, provavelmente devido ao stress térmico, que diminui a taxa de detecção de cio e a eficiência da concepção (Ambrose 2015). Também se notou uma certa sobrelotação dos parques, que por sua vez aumenta o stress por calor. Por isso, era esperada a melhoria nos índices reprodutivos com a chegada do tempo mais fresco no outono. Por outro lado, novembro e dezembro são meses com a maior taxa de refugo de vacas com problemas reprodutivas, que em termos estatísticos melhora os resultados reprodutivos, porque as vacas repetidoras (com muitas IA's sem sucesso) acabam por ser eliminadas do efetivo.

2.2. Animais do estudo

Durante o trabalho experimental e com objetivo de avaliar melhor os resultados, procurou-se harmonizar a amostragem submetendo os animais a uma igualdade de condições de tratamento: de manejo, alimentação e fornecimento de água *ad libitum*.

Para a realização do trabalho foram utilizadas 117 vacas *Bos taurus* em sistema de criação intensiva, predominantemente de raça Holstein-Frísia, múltiparas, com idades compreendidas entre os três anos e os sete anos, com as lactações a variarem entre a segunda e a sexta, que pariram entre 29 de agosto e 14 de dezembro 2015. Foram excluídas do estudo as vacas que foram sujeitas à administração de Ca antes da colheita de sangue no dia de parto, as que morreram e, por fim, as que foram objeto de erros técnicos, tais como, dificuldade na interpretação da medição da PT pelos refratómetros ou a uma deficiente recolha de dados. No final, a amostra reduziu-se a um total de 106 vacas.

2.3. Desenho experimental

Foram estudados teores séricos da PT em vacas múltiparas na altura do pós-parto, tendo em conta que as mesmas já não se encontravam em fase de crescimento. As vacas múltiparas apresentam distúrbios metabólicos no pós-parto com maior frequência do que as primíparas. Sabendo-se que as vacas sofrem uma imunossupressão no período periparto, que é mais evidente na altura do parto, procurou-se estudar uma possível relação entre os principais problemas do pós-parto (RP, metrite, mastite ou cetose) e os valores da PT como parâmetro de avaliação da função hepática e do grau de imunidade das vacas, medida no soro das vacas no dia de parto e aos cinco dias depois do parto, com o auxílio de um

refratômetro ótico de proteínas séricas (g/dL) e de um refratômetro digital (% de Brix). Nas doenças frequentes do pós-parto não foi considerado o DAE, dado que na altura da realização do ensaio apenas se registou um caso clínico. Estudaram-se também os teores séricos da PT das vacas “paratuberculose +” (ELISA).

No total foram colhidas 212 amostras de sangue, duas colheitas por cada fêmea, uma primeira colheita no dia do parto e antes da administração do Ca, em média 6h30min depois do parto, com o valor mínimo de 00h30 e máximo de 20h30 e, uma segunda colheita cinco dias depois do parto. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia coccígea utilizando-se sistema Vacutainer® sem anticoagulante, para tubos de plástico para soro com ativador de coágulo a revestir as suas paredes (partículas de sílica micronizada).

Após a colheita, as amostras foram colocadas em repouso na farmácia, entre 15 a 30 min., à temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) para facilitar a retração do coágulo; de seguida foram centrifugadas durante 2 min., a 4000 rpm (800-1 Centrifugal Machine) e, submetidas à análise com o auxílio de refratômetro ótico de proteínas séricas e o do Brix digital. O soro foi aspirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. As amostras hemolizadas foram eliminadas, tendo-se repetido a colheita. As amostras, cuja análise não foi possível ser realizada logo após a centrifugação, foram guardadas no frigorífico ($\approx 5^{\circ}\text{C}$) até uma oportunidade posterior, em média 3h30min após a recolha (dia 0), com o valor mínimo de 0h20min e máximo de 22h30min e, em média 2h15min após a segunda recolha (dia 5), com o valor mínimo de 0h15 min e máximo de 16h40min.

As colheitas de sangue foram efetuadas com ajuda de um auxiliar. Todas as medições e a recolha de dados foram realizadas pela autora do presente ensaio.

Tabela 4 Desenho experimental e eventos associados

Dia após o parto	Eventos associados
0 dpp	Avaliação da BCS
	Colheita de sangue a partir da veia coccígea
	Repouso da(s) amostra(s) para a retração do coágulo
	Centrifugação da(s) amostra(s)
	Medição da PT sérica com auxílio do refratômetro ótico de proteínas séricas (g/dL) e do digital (% de Brix) no(s) soro(s) da(s) amostra(s) centrifugada(s)
5 dpp	Colheita de sangue a partir da veia coccígea
	Repouso da(s) amostra(s) para a retração do coágulo
	Centrifugação da(s) amostra(s)
	Medição da PT sérica com auxílio do refratômetro ótico de proteínas séricas (g/dl) e do digital (% de Brix) no(s) soro(s) da(s) amostra(s) centrifugada(s)
30 dpp	Análise do histórico clínico de cada vaca parida e seleccionada
	Registo de animais sãos e doentes pós-parto (RP, metrite, mastite e cetose)

2.3.1. Avaliação da Condição Corporal (BCS)

No dia do parto, foi registrada a BCS de cada animal utilizando-se o sistema de avaliação do gado leiteiro proposto por Edmondson et al. (1989) baseado numa escala de cinco pontos (1 - extremamente magro, 5 - excessivamente gordo) e, usado na abordagem preventiva das doenças da produção. Para isso, nesse dia observavam-se as vértebras lombares, as tuberosidades do íleo e do ísquio e a inserção da base de cauda de cada vaca parida, depois de transferida do parque pré-parto/maternidade para o parque de colostro/pós-parto.

2.3.2. Diagnóstico de doenças do pós-parto

No geral, o diagnóstico das doenças do pós-parto é realizado, no dia-a-dia, por técnicos formados e treinados para o efeito, que medem a temperatura transretal em todas as vacas paridas até 10 dias depois do parto, mas também, sistematicamente pelo MVassistente. Observa-se atentamente o comportamento do animal, nomeadamente se a vaca come, bebe, se expulsou a placenta, a cor e cheiro dos corrimentos vaginais puerperais, a consistência das fezes, se claudica, se permanece muito tempo deitada, se está prostrada ou com dores, se está com sinais de hipocalcémia, o estado do úbere, para além da análise detalhada da produção de leite por cada ordenha, incluindo-se a análise da folha de quebras produtivas que se obtém automaticamente do computador central, imediatamente após a ordenha.

Considerou-se que a vaca estava com RP quando não eliminava as membranas fetais até as 24 horas depois do parto. O diagnóstico realizava-se por observação direta da parte posterior do animal com a visualização dos restos da placenta pendurados através da vulva.

Considerou-se que a vaca estava com mastite clínica quando revelava alterações macroscópicas no leite (farrapos, leite tipo “aguadilha”, presença de gás nos quartos), alterações visíveis do úbere (aumento do tamanho, presença de dor, de cor anormal, etc.), associadas a mal-estar geral e prostração da vaca, que poderia ou não estar com febre e igualmente, com uma quebra significativa na produção de leite. O diagnóstico realizava-se por observação direta da vaca e dos primeiros jatos de leite de cada quarto, realizando-se o Teste Californiano de Mastites, em caso de dúvida.

A metrite era detetada pela presença do cheiro fétido, que se nota ao aproximar da parte posterior do animal, facilmente identificável quando se colhia a temperatura retal da fêmea e, pela presença de descarga vaginal purulenta e fétida. A metrite pode ser facilmente detetada quando a vaca se encontra deitada no cubículo e, ao ter os lábios da vulva semi-abertos, se visualiza um corrimento, sendo que, na parte posterior do cubículo, observa-se a cama (areia) molhada e com cheiro fétido característico.

A cetose era detetada pela quebra de produção e por medição dos corpos cetónicos no sangue e no leite. Uma vez por mês, em todas as vacas, entre uma e as quatro semanas pós-parto, realizava-se o teste rápido de deteção de BHB no leite. Nas vacas com um resultado positivo determinava-se o BHB no sangue através de colheita na veia coccígea, utilizando-se um aparelho portátil *Precision Exceed*. Considerou-se que existia hipercetonémia quando o valor de BHB era superior a 1,2mmol/L.

O MV assistente estabeleceu vários protocolos e procedimentos a adotar e seguir pelos técnicos, caso houvesse uma confirmação de doença.

2.3.3. Recolha de dados

Para a medição da proteína total (PT) foram utilizados dois tipos de refratómetros: o ótico de proteínas séricas (g/dL) e o digital (% de Brix). O refratómetro ótico de proteínas séricas mede a PT no soro do sangue (g/dL), enquanto o refratómetro digital (% de Brix) mede os sólidos totais no soro do sangue. Os valores obtidos nas medições [PTo (g/dL) 0 dpp, PTd (% de Brix) 0 dpp, PTo (g/dL) 5 dpp, PTd (% de Brix) 5 dpp] e todas as observações relacionadas com a avaliação da BCS eram registados no local e, posteriormente, introduzidas numa tabela elaborada com recurso ao programa *Microsoft Office Excel*[®]. Os dados relativos à paridade, número de lactações, dias em lactação, IA's, doenças registadas até 30 dias pós-parto (dpp) foram obtidos através da base de dados da exploração *software* Dairy Plan. Após tratamento dos dados foi criada uma nova tabela apenas com as vacas que se adequavam ao presente estudo.

2.3.4. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com recurso ao *software* estatístico R (versão 2.4-1), o qual serviu como suporte para a construção de gráficos e tabelas e, ainda para o cálculo estatístico. A existência de fichas individuais dos animais em conjunto com o bom registo de dados da exploração, da responsabilidade dos engenheiros zootécnicos, possibilitou fazer-se a associação dos valores da PT à análise do histórico clínico de cada animal até os 30 dias pós-aprto (dpp), permitindo a posterior recolha de dados relativos às principais doenças ocorridas ou não durante esse período (RP, metrite, mastite e cetose) e a construção de grupos homogéneos (não doentes pós-parto – NÃO; doentes pós-parto – SIM; dentro das doentes pós-parto - SIM, com RP, com mastite, com metrite ou com cetose; “paratuberculose +” sem sintomas da doença pós-parto; “paratuberculose +” com sintomas da doença pós-parto) para a determinação dos teores séricos da PT.

Ao longo do presente trabalho, as informações individuais de cada animal foram introduzidas numa única base de dados criada no programa informático *Microsoft Office Excel* 2013.

Os animais foram divididos em 2 grupos: sem doença pós-parto - NÃO (n = 70) e com doença pós-parto – SIM (n = 36). Dentro do grupo com doença pós-parto (SIM) consideraram-se as seguintes doenças mais frequentes do pós-parto: RP (n = 11), mastite (n = 16), metrite (n = 14) e cetose (n = 7). Considerou-se também um terceiro grupo de vacas (n = 21), que reuniu as vacas “paratuberculose +” (diagnóstico confirmado anteriormente pelo laboratório) sem e com sintomas de doença(s) pós-parto sem e com sintomas da doença pós-parto.

Inicialmente, realizou-se o Teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar se os dados apresentavam ou não uma distribuição normal. As variáveis com distribuição normal foram então, submetidas ao teste *TStudent* de comparação de médias. Para todas as variáveis foram realizadas análises de homogeneidade das variâncias e de normalidade dos resíduos (*Shapiro-Wilk*, R versão 2.4-1). Os dados estão representados pela média, como medida de tendência central, pelo desvio-padrão, como medida de dispersão e com o seu valor a refletir a variabilidade das observações em relação à média. O nível de significância utilizado para rejeitar a hipótese H_0 (hipótese nula) para todos os dados obtidos foi $p < 0,05$ e, tendência estatística como $p > 0,10$, foram considerados na discussão dos resultados.

3. Resultados

No dia do parto (0 dpp), as vacas apresentavam uma BCS média de 3,53 pontos (Tabela 5), uma idade média de 4 anos (3,86) (Tabela 6) e encontravam-se, em média, na terceira lactação (3,04) (Tabela 7).

Tabela 5 - BCS das vacas do ensaio.

BCS	Nº de animais	Frequência relativa %
2,5	4	3,8
2,75	6	5,7
3	11	10,4
3,25	23	21,7
3,5	12	11,3
3,75	30	28,3
4	2	1,9
4,25	17	16
4,5	1	0,9
Total	106	100

Tabela 6 - Idade das vacas do ensaio.

Idade (anos)	N.º de animais	Frequência relativa (%)
3	47	44,36
4	28	26,42
5	22	20,75
6	5	4,72
7	4	3,77
Total	106	100

Tabela 7 - Nº de lactações das vacas do ensaio.

Nº de lactações	Nº de animais	Frequência relativa (%)
2	43	40,57
3	30	28,30
4	23	21,70
5	6	5,66
6	4	3,77
	106	100

O teste de normalidade *Shapiro-Wilk* confirmou que as amostras da população tinham uma distribuição normal, com os valores de $p > 0,05$.

No total de 106 vacas, 70 animais não adoeceram no pós-parto (66% NÃO) e 36 animais adoeceram nos pós-parto (34% SIM). No grupo dos animais doentes pós-parto, consideraram-se as seguintes doenças mais frequentes do pós-parto, até aos 30 dpp: RP (31%), mastite (44%), metrite (39%) e cetose (19%) (Tabela 8). Dentro do grupo com doença pós-parto (SIM), cerca de um terço dos animais (n = 12, 33%) desenvolveram mais do que uma doença nos 30 dias pós-parto (dpp) (Tabela 9).

Tabela 8 - Doenças consideradas até 30 dias pós-parto (dpp), no grupo com doença pós-parto (SIM).

Doença	Nº de animais	Frequência relativa (%) (doentes)	Frequência relativa (%) (total)
RP	11	30,56	10,38
Mastite	16	44,44	15,1
Metrite	14	38,88	13,21
Cetose	7	19,44	6,6

Tabela 9 - Vacas que desenvolveram mais do que uma doença nos 30 dias pós-parto (dpp).

Mais do que 1 doença	Nº de animais	Frequência relativa (%) (doentes)	Frequência relativa (%) (total)
RP + Metrite	4	11,11	3,77
RP + Mastite	4	11,11	3,77
Mastite + Metrite	3	8,33	2,83
RP + Mastite + Metrite	1	2,78	0,94
Total	12	33,33	11,31

Os valores e a frequência de proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) e de proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % Brix) no dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp) entre os grupos sem doença pós-parto (NÃO) e com doença pós-parto (SIM) encontram-se apresentados na Tabela 10 e nos Gráficos 1 e 2.

Tabela 10 – Proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) e proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp).

	PTo (g/dL) 0 dpp	PTo (g/dL) 5 dpp	PTd (% Brix) 0 dpp	PTd (% Brix) 5 dpp
NÃO	7,14	7,16	9,39	9,39
Desvio padrão	0,54	0,48	0,55	0,49
SIM	7,23	7,01	9,45	9,21
Desvio padrão	0,52	0,50	0,70	0,57

Gráfico 1 - Valores da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).

Frequência relativa da PTo 0dpp no grupo sem doença e no grupo com doença Frequência relativa da PTo 5dpp no grupo sem doença e no grupo com doença

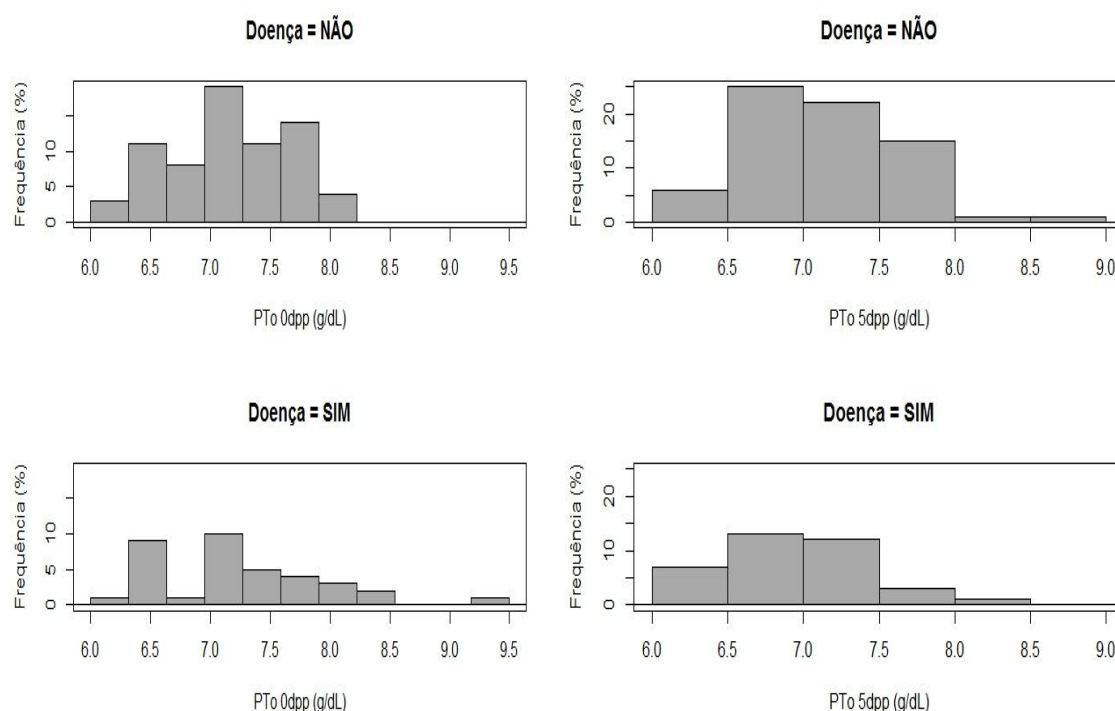
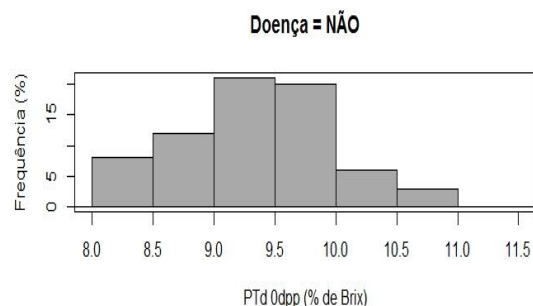
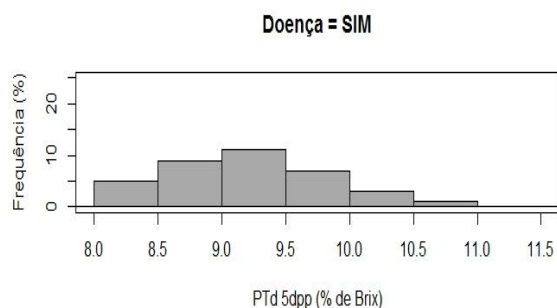
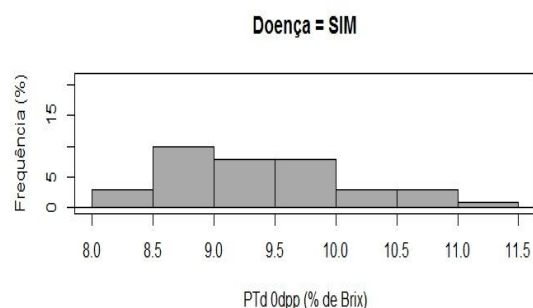
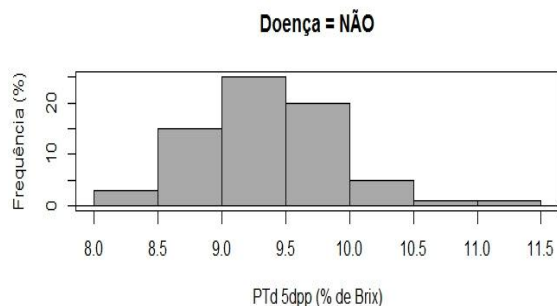


Gráfico 2 - Valores da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).

Frequência relativa da PTd 0dpp no grupo sem doença e no grupo com doença

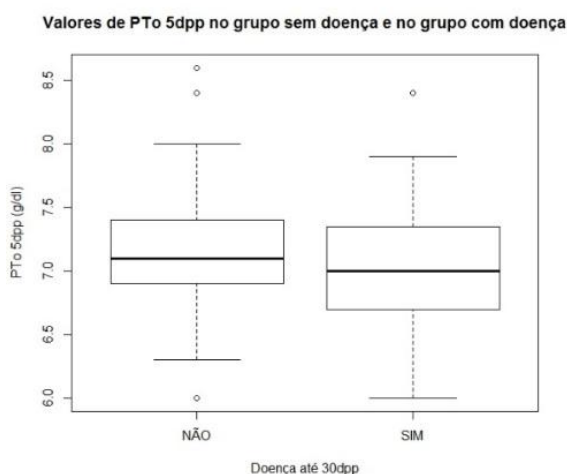
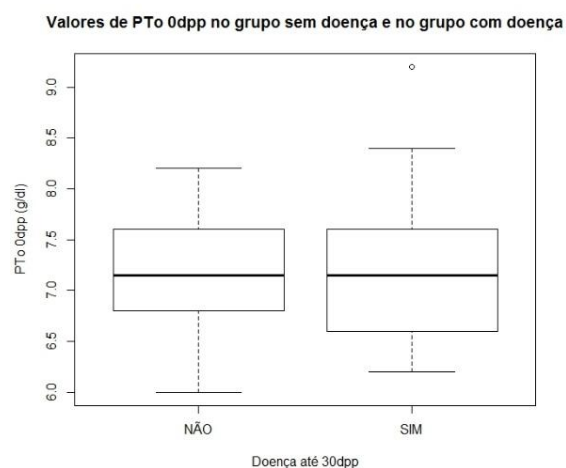


Frequência relativa da PTd 5dpp no grupo sem doença e no grupo com doença



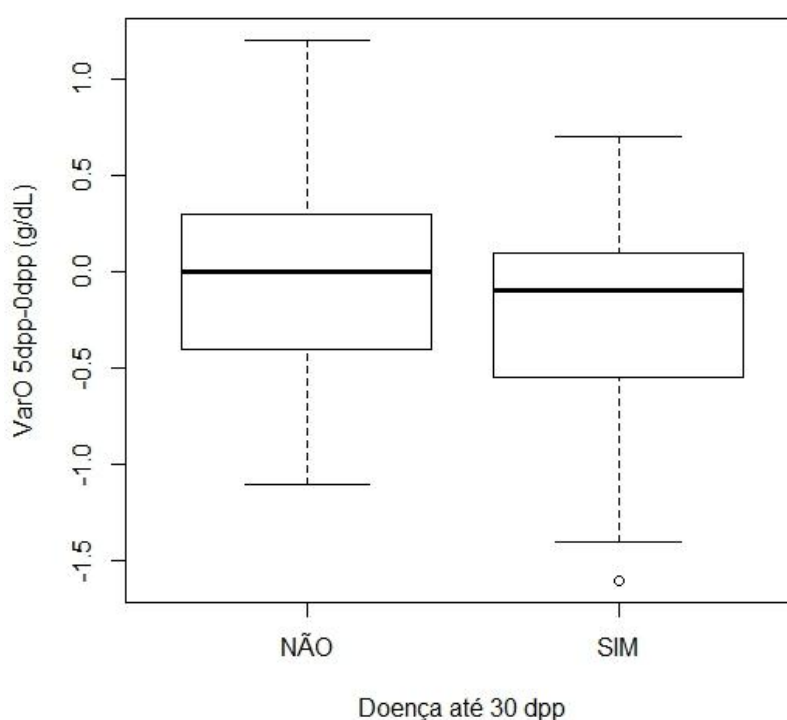
A diferença no valor da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp), entre o grupo sem doença pós-parto (NÃO) e o grupo com doença pós-parto (SIM) não foi estatisticamente significativa (*Welch Two Sample t-test*, $p > 0,05$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - *Boxplot* dos valores de proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).



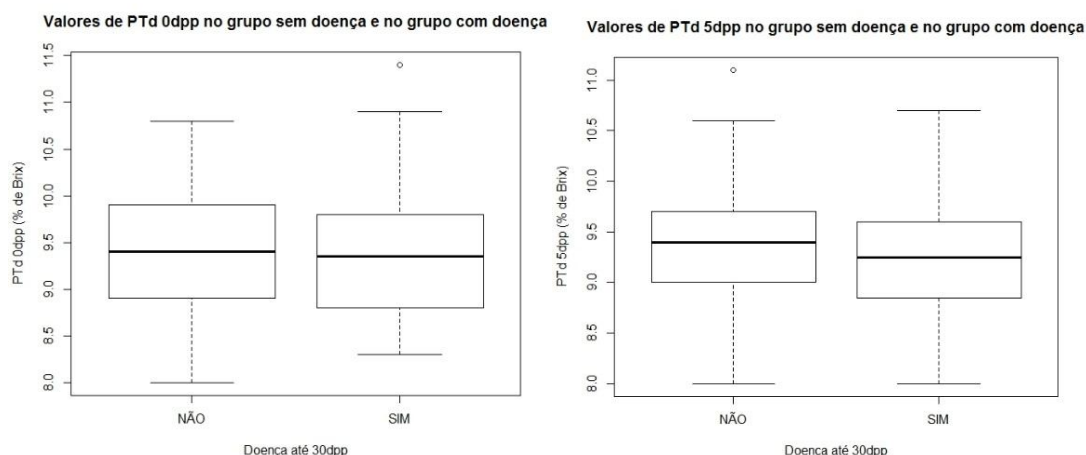
Já a variação (VarO, g/dL) da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo) entre o valor de PTo (g/dL) no dia de parto (0 dpp) vs. cinco dias depois do parto (5 dpp) foi estatisticamente significativa entre o grupo sem doença pós-parto (NÃO) e o grupo com doença pós-parto (SIM) (*Welch Two Sample t-test*, $p < 0,05$, $p = 0,02418$) (Gráfico 4). No grupo sem doença pós-parto (NÃO), a média da variação (VarO) foi de 0,016 g/dL e no grupo com doença pós-parto (SIM) foi de -0,22 g/dL, sendo que o decréscimo no valor de proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) entre o dia do parto (0 dpp) e o dia 5 pós-parto (5 dpp), poderá eventualmente, indicar presença de doença.

Gráfico 4 – Boxplot da variação (VarO, g/dL) entre o valor de proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo) no dia de parto (0 dpp) vs. cinco dias depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).



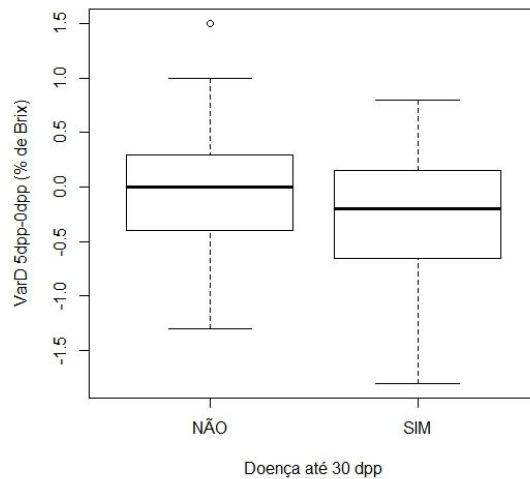
A diferença no valor de proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp) entre o grupo sem doença pós-parto (NÃO) e o grupo com doença pós-parto (SIM) não foi estatisticamente significativa (*Welch Two Sample t-test*, $p > 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Boxplot dos valores de proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) no dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).



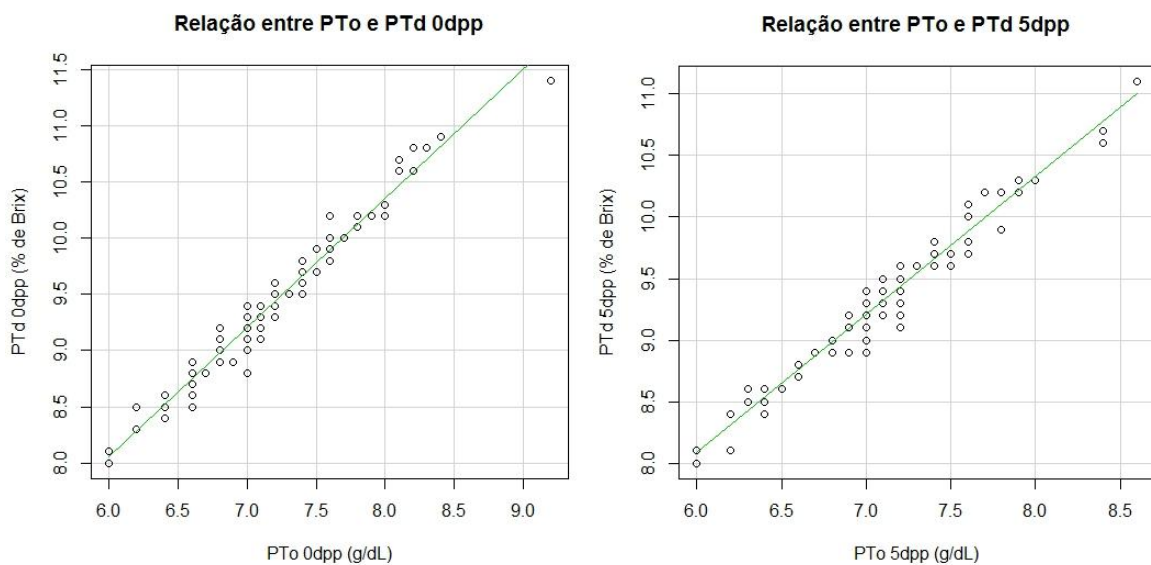
Já a variação (VarD, % de Brix) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) entre o valor de PTd (% de Brix) no dia de parto (0 dpp) vs. cinco dias depois do parto (5 dpp) foi estatisticamente significativa, mas não de forma tão marcada como na variação (VarO, g/dL) da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo), entre o grupo sem doença pós-parto (NÃO) e o grupo com doença pós-parto (SIM) (*Welch Two Sample t-test*, $p < 0,05$, $p = 0,04582$) (Gráfico 6). No grupo sem doença pós-parto (NÃO), a média da variação (VarD) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) foi de 0,006 % de Brix e no grupo com doença pós-parto (SIM), de -0,242 % de Brix, sendo que o decréscimo no valor da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) entre o dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp) poderá, muito possivelmente, significar presença de doença.

Gráfico 6 - Boxplot da variação (VarD, % de Brix) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) entre o valor da PTd (% de Brix) no dia de parto (0 dpp) vs. cinco dias depois do parto (5 dpp) no grupo sem doença pós-parto (NÃO) e no grupo com doença pós-parto (SIM).



Os dois tipos de refratômetros usados (ótico de proteínas séricas [g/dL] e digital [% de Brix]) para medir a PT sérica apresentaram uma forte correlação entre si ($\rho=0,98$) (Gráfico 7).

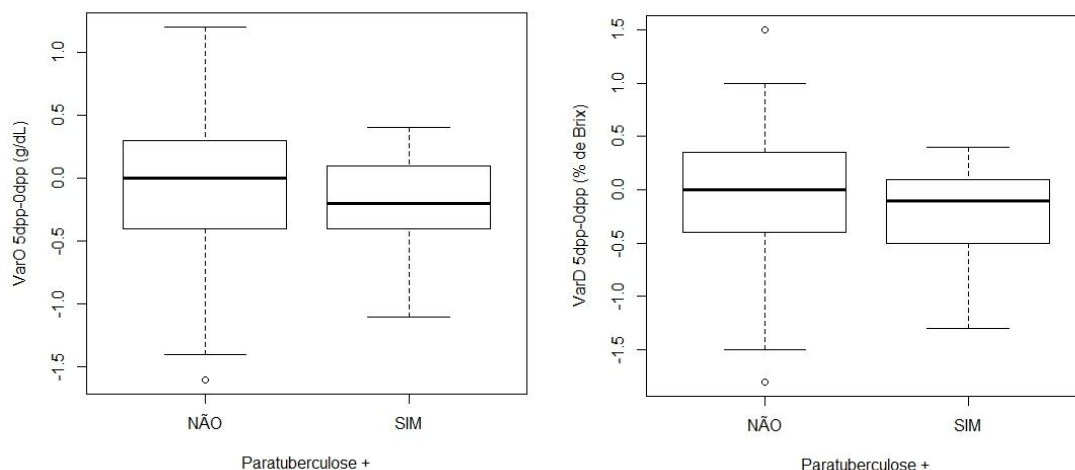
Gráfico 7 - Correlação entre os valores de proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) e proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) no dia de parto (0 dpp) e no quinto dia depois do parto (5 dpp).



A diferença no valor da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo, g/dL) e da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd, % de Brix) entre dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp) entre o grupo “paratuberculose +” sem sintomas da doença pós-parto (NÃO) e o grupo “paratuberculose +” com sintomas da doença pós-parto (SIM) não foi estatisticamente significativa (*Welch Two Sample t-test*, $p > 0,05$) (Gráfico 8), da mesma forma como a variação (VarO, g/dL) da proteína total medida pelo refratômetro

ótico (PTo) e a variação (VarD, % de Brix) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) entre o dia de parto (0 dpp) e cinco dias depois do parto (5 dpp), também o não foram (*Welch Two Sample t-test*, $p > 0,05$).

Gráfico 8 - Boxplot da variação (VarO, g/dL) da proteína total medida pelo refratômetro ótico (PTo) e da variação (VarD, % de Brix) da proteína total medida pelo refratômetro digital (PTd) entre o valor da PT no dia de parto (0 dpp) vs. cinco dias depois do parto (5 dpp) das vacas “paratuberculose +” no grupo sem sintomas da doença pós-parto (NÃO) e no grupo com sintomas da doença pós-parto (SIM).



Tendo em conta a dimensão da amostra ($n = 106$), a prevalência aparente das vacas “paratuberculose +” foi de, aproximadamente 18%. A média da prevalência real da paratuberculose na exploração foi de 25% (min. $\approx 14\%$, max. $\approx 37\%$), tendo em conta a sensibilidade (64,7%) e a especificidade (92,2%) do teste laboratorial de diagnóstico ELISA, com um intervalo de confiança de 95% (Ausvet, 2018).

Na prática para ajustar a prevalência aparente de vacas para a sensibilidade e especificidade do teste, pode-se utilizar a seguinte fórmula (Schwabe et al. 1977):

$$\text{Prevalência ajustada} = \frac{(\text{prevalência aparente} + \text{especificidade do teste} - 100)}{(\text{sensibilidade do teste} + \text{especificidade do teste} - 100)}$$
 Neste caso, a prevalência ajustada foi de aproximadamente 20%.

5. Discussão

Este trabalho foi realizado numa exploração agro-pecuária de bovinos de leite em regime de produção intensiva, sendo que a razão para escolha dos dias para a realização da medição da PT sérica se deveu ao fato de que as vacas leiteiras recém-paridas só estão sob uma vigilância mais apertada nos primeiros três a cinco dias após o parto, quando se encontram no parque do colostro, a iniciar a sua lactação.

A transição de gestação para a lactação é o período de maior stress metabólico (Piccione et al. 2012). De fato, a produção de leite e a sua composição influenciam profundamente o estado metabólico de vacas leiteiras (Heck et al. 2009). O período entre o final da gestação e início de lactação é o momento de maior alteração no metabolismo das vacas leiteiras, com cerca de 75% das doenças ocorrendo no primeiro mês pós-parto (LeBlanc 2007). Para detetar as vacas doentes no período pós-parto, o produtor usa frequentemente como a primeira abordagem, a avaliação dos registos informáticos de produção de leite (por cada ordenha), mesmo antes de olhar para o animal e/ou chamar o MV.

É de salientar que nestes animais, a produção leiteira ainda se encontra inconstante e a variar consideravelmente, ou seja, as fêmeas ainda estão no início da sua curva de lactação, podendo o valor da sua produção diária de leite sofrer algumas variações nos primeiros dias de ordenha. Nesta altura, seria útil um meio de diagnóstico complementar rápido, simples, barato e ao alcance de um técnico ou do produtor, para detetar as vacas em risco de doença, ou seja, identificá-las ainda antes da ocorrência da doença.

Embora se reconheçam algumas limitações, decorrentes dos argumentos dos críticos ao estudo da PT sérica nas vacas leiteiras no período periparto, entre as quais se destaca a influência de fatores como a desidratação, o volume plasmático e a função hepática (Piccione et al. 2012), o objetivo foi o de tentar identificar as vacas imunossuprimidas no dia de parto e no início da lactação através do valor da PT sérica, à semelhança do que se faz nos vitelos recém-nascidos após a administração do colostro (Gonzalez 1997). Sendo possível, pretendeu encontrar-se uma diferença nos valores da PT entre o dia do parto e cinco dias depois, com o objetivo de verificar se existiria alguma relação entre a variação da PT sérica, nesse período de tempo, e as doenças mais frequentes do período pós-parto, como mais um meio de diagnóstico simples, fácil, rápido e económico, de deteção das vacas em risco de doença.

O refratómetro é uma ferramenta útil e frequentemente presente nas explorações leiteiras. Os testes foram realizados nos animais que não apresentavam sinais de desidratação ou qualquer outra anomalia ao exame físico, na altura do parto, que pudesse falsear o resultado da mensuração.

No momento de parto, o quadro proteico caracteriza-se por hipoproteinemia, em decorrência da hipoalbuminemia e da hipoglobulinemia, que podem ser observadas já no terço final da gestação (Piccione et al. 2012). A queda na albumina pode estar relacionada com a quantidade de proteína na dieta, com o aumento na demanda de aminoácidos para a síntese de proteínas lácteas ou com a redução da capacidade de síntese no fígado devido a acumulação de lipídios (Eckersall 2008; Zambrano and Marques Jr. 2009), mas também pode ser atribuída aos distúrbios metabólicos e hepáticos no periparto das vacas leiteiras, o que levaria à diminuição do aporte de energia e nutrientes para a síntese hepática de proteínas, ou poderia mesmo causar lesões hepáticas que diminuíssem ou inibissem a síntese proteica (Souza 2005).

Birgel Jr. et al. (2003) relacionaram a diminuição das globulinas com as modificações na produção e distribuição dos Ac maternos, possivelmente em virtude da migração das mesmas para a glândula mamária, durante a formação do colostro. Esta queda de globulinas, observada também na PT, faz parte de um processo fisiológico que se estende aos dias seguintes ao parto (Feitosa and Birgel 2000; Nath et al. 2005; Saut 2008). Vários estudos registaram menores concentrações da PT ao parto, do que fora do período parturiente (Rowlands and Manston 1983; Grünberg et al. 2011).

No presente estudo, as concentrações da PT sérica estavam dentro da faixa normal do valor padrão fisiológico, o que está de acordo com Birgel Jr. et al. 2003 e Piccione et al. (2012) e, que para as vacas leiteiras saudáveis são 6–8 g/dL (Kessell 2015), sendo que os níveis da PT no dia do parto e cinco dias depois do parto estavam acima de 6 g/dL em todas as vacas, chegando a estar em algumas vacas (7), acima de 8 g/dL. Os resultados agora obtidos podem, por um lado, refletir o bom nível de alimentação animal existente na exploração em questão.

Não foi possível encontrar uma diferença estatisticamente significativa nos valores da PT entre os grupos de estudo (sem ou com doença pós-parto, “paratuberculose +” sem e com sintomas da doença pós-parto) no dia do parto e aos cinco dias depois do mesmo. Por outro lado, tendo em conta as variações individuais e igualmente, que as mudanças no sangue ocorrem lentamente (Payne and Payne 1987), para detetar uma real diminuição dos níveis da PT sérica nas vacas, na altura do parto, seria possivelmente necessário efetuar também as medições da PT, duas a três semanas antes de o parto ocorrer.

Segundo Cargile and Tracy (2015), os valores da BCS recomendados para vacas leiteiras para a altura do parto devem estar entre 3,0 e 3,25. Os extremos, em termos de BCS, são sempre prejudiciais para as vacas leiteiras que apresentem um BEN, uma função hepática prejudicada ou uma resposta imunitária mais fraca, no periparto (Ingvarlsen and Moyes, 2013).

No presente estudo, a média da BCS foi de 3,53, sendo que 10 animais (9,5%) tinham a BCS entre 2,5-2,75, ou seja, estavam abaixo da recomendada e, 20 vacas (18,8%) estavam com a BCS acima de 3,75, ou seja, com excesso de BCS. É importante salientar que em comparação com as vacas mais magras, as vacas com excesso da BCS revelam maior predisposição para sofrer uma perda mais acentuada da DMI, com um aumento da acumulação dos AGNE e do BHB, no sangue e, dos TG no fígado, durante o início da lactação, sofrendo assim um BEN mais profundo e aumentando ainda mais, o risco de doenças infecciosas e não infecciosas (Janovick et al. 2011).

No presente trabalho, a incidência de doenças no primeiro mês pós-parto foi de 34% (36 animais). Dentro do grupo de animais que revelaram RP, 9 das 11 vacas foram também afetadas por metrite e/ou mastite. Segundo Ruiz et al. (2016), a RP é uma doença associada à imunossupressão e, por isso, as vacas afetadas apresentam uma maior predisposição para outras doenças como a mastite ou a metrite.

Tendo em conta que, no presente estudo, 7 vacas (6,6%) tiveram a cetose primária, sem apresentar nenhuma outra doença, fato que mais parece estar relacionado com um desequilíbrio metabólico, ao contrário dos restantes animais do grupo com doença, onde provavelmente, estariam envolvidos fatores ligados à imunossupressão, principalmente o stress, que afeta os animais em produção intensiva. Segundo Stilwell (2013), a prevalência da cetose clínica acima dos 2% aconselha à uma revisão do manejo e da nutrição, sendo que outros autores referem valores de 5% e que valores mais elevados representam perdas económicas significativas (Schein 2012).

Na exploração leiteira onde o estudo foi realizado existe um programa de controlo da cetose que permite a deteção precoce das vacas com hipercetonémia através de um teste rápido (Ketotest®, ELANCO), no leite e da confirmação da concentração do BHB, no sangue. No histórico clínico das vacas, só se lança o diagnóstico e o tratamento da cetose, se os valores do BHB no sangue forem superiores a 1,2 mmol/L e coexistir uma quebra da produção de leite. Apesar disso, é preciso ter alguma cautela na interpretação dos resultados relacionados com os animais hipercetonémicos, uma vez que a hipercetonémia em vacas leiteiras de alta produção, parece ser parte de uma resposta de adaptação fisiológica ao BEN nas fêmeas em período de transição, sendo que nem sempre são afetados a produção leiteira e o desempenho reprodutivo (Ruoff et al. 2016).

Neste estudo, os dois tipos de refratômetros usados para medir a PT sérica apresentaram uma forte correlação entre si ($\rho=0,98$), sendo ambas as ferramentas foram fiáveis para esse fim, quando usados em vacas leiteiras. Apesar da maioria dos estudos, onde foi efetuada a comparação dos refratômetros ótico e digital, se ter usado soro de vitelos recém-nascidos nas medições da PT (Elsohaby et al. 2015), era lógico esperar-se um

resultado equivalente nas medições da PT sérica em vacas adultas, fato que foi agora comprovado.

Nas vacas “paratuberculose +”, a VarO (g/dL) e a VarD (% de Brix) da PT sérica no dia de parto versus cinco dias depois do parto, não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos sem (NÃO) e com sintomas da doença pós-parto (SIM), provavelmente porque o *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) pode colonizar animais por anos sem causar a doença (Gurjav et al. 2015), sendo que a maioria das infecções são subclínicas (Vazquez et al. 2014).

No grupo de animais com doença pós-parto (SIM), os teores séricos da PT sofreram alterações estatisticamente significativas entre o dia do parto e o dia cinco depois do parto, sendo que as vacas que adoeceram apresentaram uma variação negativa da PT sérica, ou seja, o valor da PT diminuiu entre o dia de parto e cinco dias depois. Nas vacas adultas, a diminuição da PT sérica pode estar relacionada com falhas hepáticas (fígado gordo ou cirrose hepática), com os transtornos renais (síndrome nefrótica) e intestinais (síndrome de má absorção, enteropatia), com as hemorragias ou por deficiência na alimentação (subnutrição) (González and Scheffer 2003; Eckersall 2008). No presente estudo, é difícil definir se a diminuição da PT entre o dia do parto e cinco dias pós-parto foi um resultado do grave comprometimento da função hepática e do BEN que provoca uma queda significativa na IMS, induzindo estado de desequilíbrio metabólico e de imunossupressão, aumentando o risco de doenças infecciosas. Ou, por outro lado, a diminuição da PT foi uma consequência das doenças infecciosas, como o resultado da imunossupressão, e que estão acompanhadas por liberação de toxinas e de fatores pro-inflamatórios, que são hepato-nefrotóxicos e podem, por sua vez, provocar a depressão do estado geral dos animais, diminuindo a IMS e a produção das proteínas no fígado, aumentando ao mesmo tempo a sua perda (diarreia, proteinúria).

Na prática, as medições da PT sérica com auxílio de um refratômetro, seriam úteis nas vacas leiteiras secas ainda antes do parto (três a uma semana antes da data prevista do parto) numa tentativa de comparar os valores da PT obtidos, com os padrões fisiológicos já estabelecidos e, eventualmente, identificar as vacas potencialmente imunodeprimidas e que estariam em maior risco de adoecer. Dessa forma, o produtor poderia trabalhar na prevenção, tomar várias medidas corretivas atempadamente, reagir antes da doença se manifestar clinicamente reduzindo a sua extensão, gravidade e as consequências, podendo também, inclusivamente, optar por administrar um medicamento imunomodulador.

A prevalência aparente da paratuberculose mostra uma proporção de animais com resultados ELISA positivos, sem corrigir a sensibilidade e a especificidade imperfeitas do teste de diagnóstico ELISA. A prevalência real revela o nível de paratuberculose numa população, estimado com base em teste de diagnóstico ELISA de elementos da população,

ou por outras palavras, a percentagem de vacas que deveriam testar positivo. A especificidade de um teste é a probabilidade de identificar corretamente os animais não infectados. No teste ELISA é bastante alta, ou seja, 92,2% das vacas não infectadas foram negativas. A sensibilidade de um teste revela a probabilidade de identificar corretamente os animais infectados, sendo que no teste ELISA empregado é relativamente baixa. Assim sendo, só 64,7% das vacas verdadeiramente infectadas foram detetadas pelo teste ELISA, o que traz uma preocupação, porque existe uma percentagem significativa de animais doentes não detetados (35,3%). A prevalência real incluiu os animais “paratuberculose +” que não são detetados por teste de ELISA, dadas as restrições da sua sensibilidade (NAHMS, 1997).

6. Conclusão

Com este estudo demonstrou-se, em termos práticos, que a mensuração da PT sérica em vacas leiteiras, com o auxílio de um refratómetro, no dia do parto e cinco dias depois do mesmo, não trouxe informação relevante para a clínica de campo e não permitiu obter resultados úteis para o produtor. A utilização da medição da PT em vacas recém-paridas, no dia-a-dia da exploração leiteira revelou-se pois, pouco útil, permitindo unicamente verificar que os valores da PT se encontravam dentro dos limites fisiológicos anteriormente padronizados.

É de salientar que neste estudo, o valor da PT sérica medido no dia de parto e cinco dias depois, por si só, não tem utilidade prática e não oferece nenhuma informação adicional, além da comparação com o valor padrão fisiológico médio já estabelecido para as vacas Holstein-Frísias. Já a variação da PT sérica que ocorreu neste período de tempo, é de uma possível valorização, sendo necessária a realização de mais estudos, no futuro.

Apesar de se ter registado uma variação da PT sérica estatisticamente significativa entre o dia de parto e cinco dias depois do mesmo, no grupo de vacas com doença pós-parto (SIM), no campo prático é difícil afirmar-se que essa variação negativa da PT sérica é um sinal de doença, tendo em conta que até a data não existem outros estudos que o confirmem.

É de todo o interesse que futuramente se desenvolvam estudos idênticos ao presente trabalho, com um maior número de animais experimentais, de modo a obter conclusões mais consistentes. É necessário aumentar o tamanho da amostra no grupo com doença, inclusivamente dentro do grupo de cada doença do pós-parto (PR, metrite, mastite e cetose), para se obter resultados mais conclusivos.

Também seria útil tentar perceber como se comporta a PT nas vacas que adoecem e inclusivamente, nos subgrupos com determinada(s) doença(s) mais comuns do pós-parto, aumentando-se o número de animais, tentando confirmar a variação negativa do valor da PT

sérica, ou seja, se o valor da PT diminui de fato, entre o dia de parto e o quinto dia após o mesmo.

E finalmente, seria interessante confirmar se a variação negativa no valor da PT sérica é realmente um sinal de doença, ou seja, se está associada à doença, o que poderia associar a PT sérica ao estado imunitário de vacas, à semelhança do que acontece com a PT sérica dos vitelos recém-nascidos após a administração do colostro, quando testados para a TIP.

Em termos práticos, as mensurações da PT sérica com o auxílio de um refratômetro seriam úteis nas vacas leiteiras secas, ainda antes do parto, por exemplo, uma a três semanas antes do parto, com o objetivo principal de se poder trabalhar na prevenção, identificando eventualmente, as vacas imunodeprimidas, com os valores de PT sérica inferiores aos limites fisiológicos já conhecidos e padronizados.

As proteínas circulantes, principalmente a albumina, parecem estar associadas a saúde ao nível da vaca e podem ser modestamente responsivas a mudanças na dieta. No entanto, é necessária uma avaliação mais abrangente para determinar a utilidade dessa e de outras frações circulantes de proteínas como ferramentas de diagnóstico no efetivo (Overton and Burhans 2013).

Bibliografia

- [EAH] Elanco Animal Health 2015. Vital 90™ Days. [Internet] [acedido 2016 Nov 01]. <https://www.elanco.us/vital-90-days>.
- [NAHMS] National Animal Health Monitoring System 1997. Johne's Disease on U.S. Dairy Operations. USDA: APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System. Fort Collins, CO. N245.1097.
- [USDA] United States Department of Agriculture 2005. Johne's Disease on U.S. Dairy Operations, 2002 USDA: APHIS:VS: CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO #N427.0205
- [VS] Veterinary Services. 2008. Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991–2007. APHIS Info Sheet. [Internet] [acedido 2018 Mai 15]. http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Johnes.pdf
- Adams RS, Stout WL, Kradel DC, Guss Jr. BS, Moser BL, Jung GA. 1978. Use and Limitations of Profiles in Assessing Health or Nutritional Status of Dairy Herds. *J Dairy Sci.*, 61:1671-9.
- Aguggini IG, Nava G. 1958. Il comportamento delle sieroproteine nella gravidanza dei bovini. *Arch. vet. ital.*, 9(3):229-34.
- Aires T. 2005. Análise dos “custos diretos” da ocorrência de mastites em explorações de Entre-Douro-e-Minho no ano de 2005. [relatório de estágio]. Lisboa: FMV - Universidade Técnica de Lisboa.
- Akers RM. 1985. Lactogenic hormones: binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation, and milk biosynthesis in ruminants. *J. Dairy Sci.*, 68:501-19.
- Alberghina A, Piccione G, Casella S, Panzera M, Morgante M, Ganesella M. 2013. The effect of the season on some blood metabolites and haptoglobin in dairy cows during the postpartum period. *Archiv Tierzucht.*, 56:354–9.
- Al-Mujalli, A-A M. 2008. Studies on Some Serum Constituents of Dairy Cows in Saudi Arabia. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, 9(2):105-14.1429.
- Alsemgeest SPM, Taverne MAM, Boosman R, van Der Weyden BC, Gruys E. 1993. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *Am. J. Vet. Res.*, 54:164-7.
- Amaral BC, Connor EE, Tao S, Hayen J, Bubolz J, Dahl GE. 2009. Heat-stress abatement during the dry period: Does cooling improve transition into lactation? *J. Dairy Sci.*, 92(12):5988-99.
- Atalay H. (2019). The effect of serum β -hydroxybutyric acid and calcium levels on left displaced abomasum in Holstein cows on transition period. *J. Istanbul Vet. Sci.*, 3(2):43-8.
- Ausvet: EpiTools epidemiological calculators 2018. [acedido 2018 Abr 17]. <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=TruePrevalence&SampleSize=106&Pos=19&Sens=0.68&Spec=0.99&M=123&R=721&Conf=0.95>
- Baglioni, T, Locatelli A, Quarenghi F. 1957. Il quadro siero proteico dei vitello nei primo giorni de vita. *Arch. vet. ital.*, 8 (1):1 -1 6.
- Bartier AL, Windeyer MC, Doepel L. 2015. Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. *J. Dairy Sci.*, 98:1878-84.

- Bauman DE, Currie, WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J. Dairy Sci., 63:1514-29.
- Baus E, Andris F, Dubois M, Urbain J, Leo O. 1996. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. J. Immunol., 156:4556-61.
- Beard PM, Henderson D, Daniels MJ, Pirie A, Buxton D, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Rhind S, Stevenson K, Sharp JM. 1999. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Vet. Rec., 145:612-3.
- Bell A, Burhans WS, Overton TR. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. Proceedings of the Nutrition Society, T. 59:119-26.
- Benysek V, Kudlac E. (1971). The red blood picture in cows in the last month of pregnancy, during parturition and the period of puerperium. Acta vet., Brno 40:177-85.
- Bharathy S, Gunaseelan L, Porteen K. 2017. Exploring the potential hazard of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a cause for Crohn's disease. Vet. World, 10(4):457-60.
- Birgel Jr EH, Neves FS, Salvatore LCA, Miranda RM, Tavora JPF, Birgel EH. 2003. Avaliação da influência da gestação e do puerpério sobre a função hepática de bovinos da raça Holandesa. Ars Veterinária, Jaboticabal, 19 (2):172-8.
- Bossaert P, Trevisi E, Opsomer G, Bertoni G, De Vliegher S, J.L.M.R. Leroy JLMR. 2012. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. Vet. J., 192:222-5.
- Burhans WS. 2006. Effects of Nutritional Management on Peripartum Glucose and Energy Metabolism and Postpartum Health in Transition Dairy Cows. Ph.D. Dissertation. Cornell University, Ithaca, NY.
- Burton JL, Kehrli, Jr. ME, Kapil S, Horst RL. 1995. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. J. Leukoc. Biol., 57:317-25.
- Burton JL, Madsen SA, Chang LC, Weber PS, Buckham KR, van Dorp R, Hickey MC, Earley B. 2005. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. Vet. Immunol. Immunopathol., 105:197-219.
- Burvenich C, Bannerman DD, Lippolis JD, Peelman L, Nonnecke BJ, Kehrli ME, Jr., Paape MJ. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. J. Dairy Sci., 90(1):E39-54.
- Butler WR, Smith R. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. J. Dairy Sci., 72:767-83.
- Caballero CA, Vallenás AP. 1958. Estudio de las proteínas del suero sanguíneo en relación con la preñez avanzada y con el parto en vacunos. Rev. Med. vet. (Lima), 13:169-81.
- Cai T-Q, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. Am. J. Vet. Res., 55(7):934-43.

- Campos AGS., Afonso JAB, Santos R, Mendonça CL, Guimarães JA. 2010. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Ciênc. Anim. Bras.*, 11(3):623-8.
- Campos R, Carreno ES, González FD. 2004. Perfil metabólico en vacas nativas. *Revista Orinoquia*, 8(2):32-41.
- Campos R, Cubillos C, Rodas A. 2007. Indicadores metabólicos en razas especializadas en condiciones tropicales en Colombia. *Acta Agronómica*, 56(2):85-92.
- Campos RG, García KA, Hernández EA, Patiño LG. 2012. Protein and mineral metabolites for dairy cows during the transition period under tropical conditions. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 65(2).
- Cargile B, Tracy D. 2015. Interaction of Nutrition and Reproduction in the Dairy Cow. In R. McR. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction*. (pp. 283-9). Wiley, USA, ISBN.
- Carruthers DM, Arrol HP, Bacon PA, Young SP. 2000. Dysregulated intracellular Ca²⁺ stores and Ca²⁺ signaling in synovial fluid T lymphocytes from patients with chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, 43:1257–65.
- Ceballos A, Villa NA, Bohórquez A, Quiceno J, Jaramillo M, Giraldo G. 2002. Análisis de los resultados de perfiles metabólicos en lecherías del tropico alto del eje cafetero colombiano. *Revta Colombiana Cienc. Pecuarias* 15:26-35.
- Chamberlain AT, Wilkinson JM. 1996. *Feeding the Dairy Cow*. Chalcombe Publications, Lincoln, UK.
- Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, Santos JE, Leblanc SJ. 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J. Dairy Sci.*, 94:4897-903.
- Chassagne M, Barnouin J. 1992. Circulating monocyte and red cell counts as precalving predictors for retained placenta occurrence in dairy cows under field conditions in France. Conference: VIIIth International Symposium for Veterinary Epidemiology and Economics, At Paris, Volume: 1, n° 31-2.
- Clarke CJ. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.*, 116:217-61.
- Clemens LE, Pentti K, Stites SP, Stites DP. 1979. Mechanism of Immunosuppression of Progesterone on Maternal Lymphocyte Activation during Pregnancy. *J. Immunol.*, 122 (5):1978-85.
- Comline RS, Hall LW, Lavelle RB, Nathanielsz PW, Silver M. 1974. Parturition in the cow: endocrine changes in animals with chronically implanted catheters in the foetal and maternal circulations. *J. Endocrinol.*, 63:451-72.
- Contreras A, O'Boyle NJ, Herdt TH, Sordillo LM. 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J. Dairy Sci.*, 93:2508–16.
- Contreras GA, Sordillo LM. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 34(3):281-9.
- Contreras LL, Ryan CM, Overton TR. 2004. Effects of dry cow grouping strategy and prepartum body condition score on performance and health of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87:517-23.
- Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P. 2011. Short communication: reference values for blood parameters in Holstein dairy cows:

- effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J. Dairy Sci.*, 94:3895–901.
- Crouch SP, Crocker IP, Fletcher J. 1995. The effect of pregnancy on polymorphonuclear leukocyte function. *J. Immunol.*, 155:5436–43.
- Curtis C, Erb H, Sniffen C, Smith R, Kronfeld D. 1985. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 68:2347-60.
- D’Angelino JL, Araujo LM, Birgel EH, Reichmann CE, Araujo WP. 1975. Influência da gestação e do purpério sobre o proteinograma sanguíneo de bovinos da raça Holandesa Branca e Preta. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 12:197-204.
- Davis WC, Madsen-Bouterse SA. 2012. Crohn’s disease and *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*: the need for a study is long overdue. *Vet. Immunol. Immunop.*, 145:1-6.
- Detilleux JC, Kehrl ME, Jr., Stabel JR, Freeman AE, Kelley DH. 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 44(3):251-67.
- Detilleux JC, Koehler KJ, Freeman AE, Kehrl ME, Jr., Kelley DH. 1994. Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: genetic variation. *J. Dairy Sci.*, 77(9):2640-50.
- Dirksen G, Breitner W. 1993. A New Quick-Test for Semiquantitative Determination of Beta-Hydroxybutyric Acid in Bovine Milk. *Journal of Vet. Medicine Series A*, 40(1-10):779–84.
- Divers TJ, Peek SF. 2008. *Rebhun’s Diseases of Dairy Cattle*. (S. Elsevier, Ed.) (2o ed., p. 686). Penny Rudolph.
- Drackley JK, Dann HM, Douglas N, Guretzky NAJ, Litherland NB, Underwood JP, Looor JJ. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Animal Sci.*, 4:323-44.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 93(12):5764–71.
- Dubuc J. 2011. Postpartum Uterine Diseases: Prevalence, Impacts, and Treatments. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 23:255-67.
- Duffield T, Blanc LE, Leslie K. 2005. Impact of subclinical metabolic diseases on risk of early lactation culling. *J. Dairy Sci.*, 88(Suppl. 1):199-200.
- Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.*, 92:571–80.
- Dunlap JS, Dickson WM. 1955. The effect of age and pregnancy on ovine blood protein fractions. *Amer. J. Vet. Res.*, 16:91-5.
- Dyk PB, Emery RS, Liesman JL, Bucholtz HF, VandeHaar MJ. 1995. Peripartum non-esterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems. *J. Dairy Sci.*, 78 (Supl.):264.
- Eckersall PD. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: Kanekom JJ, Harvey JW, Bruss ML (Eds.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. (6th ed.). (pp.117–55), Elsevier Academic Press, California.

- Ehlert R. 1985. Chemotactic activity and leukocyte count in the bovine placentome, with reference to placental detachment. *Veterinary Bulletin*, 55(12):992, 7997.
- Elsobhy I, McClure JT, Keefe GP. 2015. Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. *J. Vet. Intern Med.*, 29 (2):721–6.
- Emanuelson U, Oltenacu PA, Grohn YT. 1993. Nonlinear mixed model analyses of five production disorders of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 76:2765-72.
- Esslemont JR. 2012. The costs of ketosis in dairy cows. *Proceedings of the 27th World Buiatrics Congress; Lisbon, Portugal. 2012.* p. 156.
- Fagliari JJ, Santan AE, Marchio W, Campos Filho E, Curi PR. 1998. Constituintes sanguíneos de vacas das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murah durante a gestação, no dia do parto e no puerpério. *Arquivo Bras. de Med. Vet. e Zootecnia*, 50(3):273-82.
- Feitosa FLF, Birgel EH. 2000. Variação da concentração de imunoglobulinas G e M, de proteínas totais e suas frações eletroforéticas e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo de vacas holandesas, antes e após o parto. *Belo Horizonte. Arquivo Bras. de Med. Vet. e Zootecnia*, 52(2).
- Feitosa FLF, Camargo DG, Yanaka R, Mendes LCN, Peiró JR, Bovino F, Lisboa JAN, Perri SHV, Gasparelli ERF. 2010. Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. *Pesquisa Vet. Bras.*, 30:696-704.
- Field RW, Bretzlaff KN, Elmore RG, Rupp GP. 1989. Effect of induction of parturition on immunoglobulin content of colostrum and calf serum. *Theriogenology*, 32(3):501-6.
- Franklin ST, Young JW, Nonnecke BJ. 1991. Effects of Ketones, Acetate, Butyrate, and Glucose on Bovine Lymphocyte Proliferation. *J. Dairy Sci.*, 74(8):2507-14.
- Friggens NC. 2003. Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding. *Livest. Prod. Sci.*, 83:219-36.
- Garry F, Wells S, Ott S, Hansen D. 1999. Who can afford a \$200 loss per cow? OR John's disease - What do I need to know? *Info Sheet. USDA, APHIS, VS.*
- George JW. 2001. The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: An historical and technical review. *Vet. Clinical Pathology*, 30: 201–10.
- Giannetto C, Giudice E, Casella S, Fazio F, Alberghina D, Piccione G. 2011. Thermal stress and acute phase protein blood levels in cows. *Large Anim Rev* 17, 3-6.
- Gilbert RO, Gröhn YT, Miller PM, Hoffman DJ. 1993. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 36:75-82.
- Goff JP, Horst RL. 1997. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *J Dairy Sci.*, 80:1260–8.

- Goff JP, Stabel JR. 1990. Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J. Dairy Sci.*, 73(11): 3195-9.
- Goff JP. 2008. Transition cow immune function and interaction with metabolic disease. In: *Proceedings from the TriState Dairy Nutrition Conference*; April 22-23.
- Gonçalves D, Kozicki LE. 1997. Perfis bioquímicos e imunológicos no período peripartal de vacas leiteiras com e sem retenção de placenta. *Braz. Journal Vet. Res. Anim. Sci.*, 34:364-70.
- González FHD, Muiño R, Pereira V, Campos R, Benedito JL. 2011. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.*, 3:251-5.
- González FHD, Rocha JA. 1998. Metabolic profile variations and reproduction performance in holstein cows of different milk yields in southern Brazil. *Arquivo da Faculdade de Veterinária. UFRGS*, v.26: 52-64.
- González FHD, Scheffer JFS. 2003. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. *Simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do brasil. Porto Alegre: UFRGS*, p.73-87.
- González FHD. 1997. O perfil metabólico no estudo de doenças da produção em vacas leiteiras. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.25:13-33.
- Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.*, 20:447-70.
- Grummer RR. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feed transition dairy cow. *J. Animal Sci.*, 73:2820-33.
- Grünberg W, Donkin SS, Constable PD. 2011. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94(11):727-45.
- Gunnink JW. (1984a). Pre-partum leukocyte activity and retained placenta. *Vet. Q.*, 6:52-5.
- Gunnink JW. (1984b). Retained placenta and leukocytic activity. *Vet. Q.*, 6(2):49-51.
- Gunnink JW. (1984c). Post-partum leucocytic activity and its relationship to caesarian section and retained placenta. *Vet. Q.*, 6:55-7.
- Gurjav U, Burneebaatar B, Narmandakh E, Tumenbayar O, Ochirbat B, Hill-Cawthorne GA, Marais BJ, Sintchenko V. 2015. Spatiotemporal evidence for cross-border spread of MDR-TB along the trans-Siberian railway line. *International J. Tuberculosis and Lung Disease*, 19(11):1376-82.
- Hafez ESE. *Reprodução Animal*. 7. ed. São Paulo: Editora Manoele, p. 276 – 7, 2004.
- Hagnestam-Nielsen C, Østergaard S. 2009. Economic impact of clinical mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses. *Animal*, 3(2):315.

- Hamana K, Usui K. 1972. Changes in serum and plasma protein levels associated with pregnancy and parturition in the bovine and the rabbit. I. Bovine serum protein. Bull. Fac. Agric., Myazaki, 19(1):193-200.
- Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. Veterinary Immunology and Immunopathology, 113(1-2):21–9.
- Hammon DS, Goff JP. 2006. Immune Function and Energy status in Holstein cows with uterine infections. Pfizer animal health and USDA, national animal disease center. Mid-South Ruminant Nutrition Conference, p.29-36.
- Hansson GK. 2005. Inflammation, Artherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N. Eng. J. Med., 352:1685-95.
- Heck JML, van Valenberg HJF, Dijkstra J, van Hooijdonk ACM. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. J. Dairy Sci., T. 92:4745–55.
- Heuwieser W, Grunert E. 1987. Significance of chemotactic activity for placental expulsion in cattle. Theriogenology, 27(6):907-12.
- Heyneman R, Burvenich C, Vercauteren R. 1990. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. J. Dairy Sci., 73: 985-94.
- Hoeben D, Burvenich C, Trevisi E, Bertoni G, Hamann J, Bruckmaier RM, Blum JW. 2000. Role of endotoxin and TNF- α in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. J. Dairy Res., 67(4):503-14.
- Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. 1997. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. Vet. Immunol. Immunopathol., 58(2):165-70.
- Hoedemaker M, Lund LA, Wagner WC. 1992. Function of neutrophils and chemoattractant properties of fetal placental tissue during the last month of pregnancy in cows. Am. J. Vet. Res., 53:1524-9.
- Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE, Brockett BL et al. 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. J. Dairy Sci., 72(6):1547-56.
- Hopster H, Van Der Werf JTN, Blokhuis HJ. 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. Vet. Immunol. Immunop., 66:83-97.
- Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. 1994. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. J. Dairy Sci., 77:1936–51.
- Horst RL, Jorgensen NA. 1982. Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. J Dairy Sci., 65(12):2332-7.
- Houdebine L-M, Djiane J, Dusanter-Fourt I, Martel P, Kelly PA, Devinoy E, Servely J-L. 1985. Hormonal action controlling mammary activity. J. Dairy Sci., 68:489-500.

- Ibanez L, Fucci A, Valls C, Ong K, Dunger D, Zegher F. 2005. Neutrophil count in small-for-gestational age children: Contrasting effects of metformin and growth hormone therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90:3435-9.
- Ingraham RH, Kappel LC. 1988. Metabolic profile testing. *Vet. Clin. N. Amer.: Food Anim. Pract.*, 4:391-411.
- Ingvartsen KL, Andersen JB. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.*, 83:1573-97.
- Ingvartsen KL, Moyes K. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *The Animal Consortium. Animal J.*, 7(s1):112-22.
- Ishikawa H, Shirahata T, Hasegawa K. 1994. Interferon- γ production of mitogen stimulated peripheral lymphocytes in perinatal cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 56(4):735-8.
- Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK. 2011. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 94:1385–1400.
- Jansakul AC, King RG, Boura ALA, Brennecke SP, Handberg GM. 1989. Plasma levels of atrial natriuretic peptides during pregnancy and post partum in the rat. *J. Endocrinology*, 120:113-7.
- Jiang SP, Vacchio MS. 1998. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal «allograft». *J. Immunol.*, 160:3086-90.
- Jones GM, Wildman EE, Troutt HF Jr., Lesch TN, Wagner PE, Boman RL, Lanning NM. 1982. Metabolic profiles in Virginia dairy herds of different milk yields. *J. Dairy Sci.*, 65:683-8.
- Jones P. 2001. Bovine paratuberculosis: ongoing challenges, renewed concerns. *In Practice*, 23:402-11.
- Jordan D, Villa NA, Gutiérrez M, Gallego AB, Ochoa GA, Marquez AC. 2006. Indicadores bioquímicos sanguíneos en ganado de lidia mantenido en pastoreo en la cordillera central colombiana. *Rev. Col. Cienc.Pec.*, 19:18-26.
- Kandefer-Szerszen M, Filar J, Szuster-Ciesielska A, Rzeski W. 1992. Suppression of interferon response of bovine leukocytes during clinical and subclinical ketosis in lactating cows. *Dtsch Tierarztl Wochenschr. Nov*; 99(11):440-3.
- Kaneene JB, Miller RA, Herdt TH, Gardiner JC. 1997. The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, 31:59-72.
- Kaneko JJ. 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5 th edn. Academic Presss, London. 117–38.
- Karsay F, Schafer M. 1984. Diagnostic experience with metabolic liver diseases of dairy cows. *Monats fur Vet.*, 39:181-6.
- Kehrli Jr ME. 2015. Immunological dysfunction in periparturient cows: Evidence, causes and ramifications. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*, February 2-4, 2015, Gainesville, Florida. p. 14-29.

- Kehrli Jr. ME, Nonnecke BJ, Roth JA. 1989a. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.*, 50:215-20.
- Kehrli Jr. ME, Nonnecke BJ, Roth JA. 1989b. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.*, 50:207-14.
- Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE, Kehrli ME, Jr., Dietz AB, Fox LK, Butler JE, Kasckovics I, Kelley DH. 1997. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 80(8):1767-75.
- Kertz AF, Reutzel LF, Thomson GM. 1991. Dry matter intake from parturition to midlactation. *J. Dairy Sci.*, 74:2290.
- Kessell A. 2015. Bovine Haematology and Biochemistry. In: Cockcroft PD (ed). *Bovine medicine*. 3th ed. USA: Wiley: p. 146-60.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli Jr ME, Harp JA, Nonnecke BJ. 2002b. Effects of mastectomy on composition of peripheral blood mononuclear cell populations in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 85:1437-44.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli Jr ME, Reinhardt TA. 2002a. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 85:544-50.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli ME, Jr. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82(11):2385-92.
- Kimura K, Reinhardt TA, Goff JP. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 89:2588-95.
- Kindzelskii AL, Espinoza J, Aratani Y, Petty HR, Clark A, Maeda N, Romero R. 2006. Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy. *European Journal Immunology*, 36(6):1619-28.
- Kindzelskii AL, Michibata H, Romero R, Ueki T, Chaiworapongsa T, Petty HR. 2004. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Form a Supramolecular Complex in Human Neutrophils That Undergoes Retrograde Trafficking during Pregnancy. *The Journal of Immunology*, 172(10):6373-81.
- Kirkeby C, Græsbøll K, Nielsen SS, Toft N, Halasa T. 2017. Epidemiological and economic consequences of purchasing livestock infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Vet. Res.*, 13(1):202.
- Klebanoff SJ. (1979). Effect of estrogens on the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Infect. Immun.*, 25(1):153-6.
- Klucinski W, Degórski A, Miernik-Degórska E, Targowski S, Winnicka A, 1988. Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *J. Vet. Med. A*. 35:632-9.
- Kremer WD, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ, Schukken YH, Heeringa R, Brand A, Burvenich C. 1993. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *J Dairy Sci.*, 76:3428-36.

- Kushibiki SS, Hodate K, Shingu H, Obara Y, Touno E, Shinoda M, Yokomizo Y. 2003. Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor- α treatment in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 86:819-27.
- Lacetera N, Franci O, Scalia D, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. 2002. Effects on functions of ovine blood mononuclear cells for each of several fatty acids at concentrations found in plasma of healthy and ketotic ewes. *Am. J. Vet. Res.*, 63: 958–62.
- Lacetera N, Franci O, Scalia D, Bernabucci U. 2004. Short Communication: Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function in Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.*, 87(4): 1012-4.
- Law RA, Young FJ, Patterson DC, Kilpatrick DJ, Wylie AR, Mayne CS. 2009. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. *J. Dairy Sci.*, 92:1001-12.
- LeBlanc SJ. 2007. Prevention of Postpartum Uterine Disease. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 19:145–55.
- Lescourret F, Coulon JB, Faye B. 1995. Predictive model of mastitis occurrence in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 78:2167-77.
- Lippolis JD, Peterson-Burch BD, Reinhardt TA. 2006. Differential expression analysis of proteins from neutrophils in the periparturient period and neutrophils from dexamethasone-treated dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 111(3- 4):149-64.
- Lippolis JD. 2009. Understanding the Relationship Between Immunity and Dairy Cow Production. *Hoard's Dairyman*. 154 (13):481.
- Little W. 1974. An effect of the stage of lactation on the concentration of albumin in the serum of dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 17:193-99.
- Lona DV, Romero RC. 2001. Low levels of colostral immunoglobulins in some dairy cows with placental retention. *J. Dairy Sci.*, (84):389-91.
- Lucy MC. 2008. Functional Differences in the Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor Axis in Cattle and Pigs: Implications for Post-partum Nutrition and Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 Suppl 2(s2): 31-9.
- Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wagter L, Wilkie BN. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.*, 81:585–95.
- Manspeaker JE. 1998. Retained Placentas. *Dairy Integrate Reproduct. Manag. IRM*. n.2:1-2.
- Manston R, Russell AM, Dew SM, Payne JM. 1975. The influence of dietary protein upon blood composition in dairy cows. *Vet. Rec.*, 96:497-502.
- Martelli A, Junior BG. 2014. Aspectos clínicos e fisiopatológicos da retenção de placenta em vacas. *Revista Saúde em Foco*, 1(1), art. 8:103-17.
- McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 95:5056-66.

- McBeath DG, Penhale WJ, Logan EF. 1971. An examination of the influence of husbandry on the plasma immunoglobulin level of the newborn calf, using a rapid refractometer test for assessing immunoglobulin content. *Vet. Rec.*, 88:266–70.
- McInerney JP, Howe KS, Schepers JA. 1992. A framework for the economic analysis of disease in farm livestock. *Preventive Vet. Medicine*, 13(2):137–54.
- Mehrzaad J, Dosogne H, Meyer E, Heyneman R, Burvenich C. 2001. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Res.*, 68(3):399-415.
- Mehrzaad J, Duchateau L, Pyorala S, Burvenich C. 2002. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.*, 85(12):3268-76.
- Melendez P, Robles J, Marín MP, Ríos C. 2009. Relationship between serum non esterified fatty acids (NEFA) at calving and the incidence of periparturient diseases in Holstein dairy cows. *Theriogenology*, 72(6):826-33.
- Moberg GP. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA (eds). *The Biology of Animal Stress*. CABI Publishing, New York, NY, USA, pp 1-21.
- Mohri M, Sharifi K, Eidi S. 2007. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res. Vet. Sci.*, T.83:30–9.
- Monfardini E, Paape MJ, Wang Y, Capuco AV, Husheem M, Wood L, Burvenich C. (2002). Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition. *Vet. Res.*, 33(3):271-81.
- Mordak R, Anthony SP. 2015. Periparturient stress and immune suppression as a potential cause of retained placenta in highly productive dairy cows: examples of prevention. *Acta Vet. Scandinavica*, 2015:57-84.
- Moreira TF, Carvalho AU, Filho EJF. 2013. Fisiologia do Período de Transição I: Metabolismo Energético. [Internet] [acedido 2016 Jun 18]. <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao/fisiologia-do-periodo-de-transicao-i-metabolismo-energetico-84714n.aspx?r=1278723470>
- Morrill KM, Polo J, Lago A, Campbell J, Quigley J, Tyler H. 2013. Estimate of serum immunoglobulin G concentration using refractometry with or without caprylic acid fractionation. *J. Dairy Sci.*, 96:4535–41.
- Mösch A. 2011 [Parameters of energy metabolism and immunoglobulin G in the serum of dairy cows in the peripartal period]. Doctoral Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany [in German].
- Mulei CM. 1991. Changes in blood chemistry in late pregnancy and early lactation and their relationships to milk production in dairy cows. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, 39:77-81.
- Mulligan FJ, O'Grady L, Rice D, Doherty ML. 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim. Reprod. Sci.*, 96(3-4): 331–53.

- Murata H, Yoshioka M, Shimada N. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *The Veterinary Journal*, 168(1):28-40.
- Nagahata H, Ogawa A, Sanada Y, Noda H, Yamamoto S. 1992. Peripartum changes in antibody producing capability of lymphocytes from dairy cows. *Vet. Q.*, 14:39-40.
- Nanda AS, Dobson H, Ward WR. 1990. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 49(1):25–8.
- Nath HC, Baruah KK, Baruah A, Sarmah HD, Sarmah BC. 2005. Serum cholesterol and protein in pre, peri and postpartum in cows. *Indian Vet. J.*, 82:519-21.
- Nejra H, Krnić J, Aida H. 2012. Concentrations of albumin and total protein in cattle blood plasma depending upon locality and seasonal changes. *Vet.*, 61(3-4):129-38.
- NMC (National Research Council). 1998. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 6th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Nonnecke BJ, Kimura K, Goff JP, Kehrli ME, Jr. 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci.*, 86(7):2359-68.
- Oliver SP, Sordillo LM. 1988. Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, 71:2584-2606.
- Opsomer G, Kruif de A. 2009. Metritis and endometritis in high yielding dairy cows. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 78:83–8.
- Overton MW. 2014. Economic consequences in the vital 90™ days. Elanco Knowledge Solutions. Elanco Animal Health. [Internet] [acedido 2016 Jun 28]. https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/37968/CNC2014_3_M.Overton.pdf;sequence=1
- Overton TR, Burhans WS. 2013. Protein metabolism of the transition cow. Cornell University Department of Animal Science. Dairy-Tech Group, Twin Falls, ID and South Albany, VT. [Internet] [acedido 2018 Mai 15]. https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/36487/CNC2013_OvertonT_m.pdf;sequence=1
- Paape MJ, Capuco AV, Guidry AJ, Burvenich C. 1994. Morphology, function and adaptation of mammary cells in normal and disease state. *ADSA Int. Cong.*, Minneapolis (USA). Lactation Workshop: Mammary Cell Adaptation. Review Paper, pp. 1-44.
- Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl J, Svastova P, du Maine R, Rychlik I. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*, 38:155–67.
- Payne JM, Payne S. 1987. *The Metabolic Profile Test*. Oxford: University Press, 1987.
- Peeler EJ, Otte MJ, Esslemont RJ. 1994. Inter-relationships of periparturient diseases in dairy cows. *Vet. Rec.*, 134:129-32.

- Pelan-Mattocks LS, Kehrlí ME, Jr., Casey TA, Goff JP. 2000. Fecal shedding of coliform bacteria during the periparturient period in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 61(12):1636-38.
- Perkins KH, VandeHaar MJ, Tempelman RJ, Burton JL. 2001. Negative energy balance does not decrease expression of leukocyte adhesion or antigenpresenting molecules in cattle. *J. Dairy Sci.*, 84:421-8.
- Piccione G, Messina V, Marafioti S, Casella S, Giannetto C, Fazio F. 2012. Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods. *Veterinarija ir Zootechnika (Vet Med Zoot)*, 58(80):59-64.
- Piccione G, Messina V, Sciano S, Casella S. 2011. Changes in serum total proteins, protein fractions and albumin-globulin ratio during neonatal period in goat kids and their mothers after parturition. *Annals of Animal Science*, 11(2):251-60.
- Polakova K, Kudrna V, Kodes A, Hucko B, Mudrik Z. 2010. Nonstructural carbohydrates in the nutrition of high yielding dairy cows during a transition period. *Czech J. Animal Sci.*, 55:468-78.
- Pösö AR, Lindberg LA. 1994. Plasma protein synthesis and serum amino acids in dry and lactating dairy cows. *J. Vet. Med.*, 41:72-5.
- Quigley J. 2001. Calf Note #39 – Using a refractometer. Colostrum and Colostrum Management. [Acedido 2018 Mai 15]. <http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN039.pdf>
- Quigley JD, Lago A, Chapman C, Erickson P, Polo J. 2013. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, 96:1148-55.
- Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2000. Clínica Veterinária, um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9º edição, guanabara koogan; pág. 1369-70.
- Raggio G, Lobley GE, Berthiaume R, Pellerin D, Allard G, Dubeuil P, Lapierre H. 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90:352-9.
- Roche JF, Mackey D, Diskin MD. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:703-12.
- Rogers AM, Boime I, Connolly J, Cook JR, Russell JH. 1998. Maternal-fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur. J. Immunol.*, 28:3479-87.
- Roitt I. 1991. Essential immunology. 7ed. Oxford, Blackwell. p.78-174.
- Romaniukowa K. 1984. Phagocytosis in the uterus. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin.* 10(4): XI 33-XI 38.
- Rossi G, Grohn YT, Schukken YH, Smith RL. 2017. The effect of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 100(9):7446-54.

- Roubies N, Panouis N, Fytianou A, Katsoulos PD, Giadinis N, Karatzias H. 2006. Effects of age and reproductive stage on certain serum biochemical parameters of Chios sheep under greek rearing conditions. *Journal Veterinary Medicine A*, T. 53:277–81.
- Rowlands GJ, Little W, Kitchenbam BA. 1977. Relationship between blood composition and fertility in Dairy Cows – A field study. *J. Dairy Res.*, 44:1-7.
- Rowlands GJ, Manston R, Pocock RM, Dew SM. 1975. Relationships between stage of lactation and pregnancy and blood composition in a herd of dairy cows and the influences of seasonal changes in on these relationships. I. *Dairy Res.*, 42: 349-62.
- Rowlands GJ, Manston R. 1983. Decline of serum albumin concentration at calving in dairy cows: its relationship with age and association with subsequent fertility. *Res. Vet. Sci.*, 34(1):90-6.
- Ruiz R, Tedeschi LO, Sepúlveda A. 2016. Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in mexican dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 100:1-13.
- Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen MJH. 1999. Effect of overfeeding during the dry period on the rate of esterification in adipose tissue of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, 82:1164-9.
- Ruoff J, Borchardt S, Mahrt A, Heuweiser W. 2016. Effects of Hyperketonemia within the First Six Weeks of Lactation on Milk Production and Reproductive Performance. *J. Adv. Dairy Res.*, 4:4.
- Sadrzadeh HS, Bozorgmehr J. 2004. Haptoglobin Phenotypes in Health and Disorders. *American Journal of Clinical Pathology*, 121 Suppl(Suppl):S97-104.
- Saut JPE, Birgel DB, de Souza RM, Pogliani FC. 2009. Influence of puerperium on the serum proteins of Saanen goats, obtained by the analysis of electrophoresis on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel. *SEMINA: CIENCIAS AGRARIAS*, 30(3):661-70.
- Saut JPE, Miyashiro SI, Raimondo RFS, Nunes MT, Mori CS, Fagliari JJ, Birgel Jr EH. 2014. Retenção de placenta no proteinograma de vacas Holandesas. *Ciência Rural*, 44 (9): 1651-7.
- Saut JPE. 2008. Influência do puerpério e da retenção de anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo. [Tese de Doutorado em Clínica Veterinária] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, SP. 116p.
- Schein I H. 2012 Cetose dos Ruminantes. UFRGS.
- Schukken YH. 1989. Retained placenta and mastitis. *The Cornell veterinarian*, 79(2):129-31.
- Schwabe CW, Riemann HP, Franti CE. 1977. *Epidemiology in Veterinary Practice*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, p. 78.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth H. 2009. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biology of Reprod.*, 81(April):1025–32.

- Sheldon IM, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Repr. Sci.*, 64:295-306.
- Smith BI, Donovan GA, Risco CA, Young CR, Stanker LH. 1998. Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. *Vet. Rec.*, 142:83-5.
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. 1985. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.*, 68(2):402-17.
- Sohmiya M, Kanazawa I, Kato Y. 2005. Effect of recombinant human GH on circulating granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils in patients with adult GH deficiency. *Eur. J. Endocrinol.*, 152:211-5.
- Sommer H. Preventive medicine in dairy cows. *Veterinary Medicine Review* v.44, p.42-63, 1975.
- Sordillo LM, Contreras GA, Altken SL. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.*, 10:53-63.
- Sordillo LM. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Lives. Prod. Sci.*, 98:89-99.
- Souza RM, Garcia NACR, Birgel DB, Birgel Jr EH. 2008. Influência do puerpério e da fase pós-puerperal na função hepática de vacas da raça Holandesa criadas no Estado de São Paulo. [Internet] *Ciência Animal Bras.*, 9(1):140-147. [acesso 2018 Mai 30]. <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/844>>.
- Souza RM, Yasuoka MM, Leão DA, Junior EHB. 2010. Inter-relações entre a função hepática, lipidograma e os distúrbios inflamatórios do endométrio (endometrites puerperais agudas, retenção dos anexos fetais e catarros genitais) de fêmeas bovinas da raça Holandesa. [Internet] *Ciência Anim. Bras.*, 11(4):880-7. [acesso 2018 Mai 7]. <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/5123>>.
- Souza RM. 2005. Avaliação da função hepática e do lipidograma no período puerperal e pós-puerperal e suas inter-relações com os distúrbios reprodutivos de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo. [dissertação de mestrado em clínica veterinária] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, SP. 192p
- Spain JN, Scheer WA. 2002. The 100-day contract with the dairy cow: 30 days prepartum to 70 days postpartum. *Advances in Dairy Technology*, 14:19.
- Stabel JR, Robbe-Austerman S. 2011. Early immune markers associated with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin. Vaccine Immunol.* Mar;18(3):393-405.
- Stevens MG, Peelman LJ, De SB, Pezeshki A, Van De Walle GR, Duchateau L, Burvenich C. 2011. Differential gene expression of the toll-like receptor-4 cascade and neutrophil function in early- and mid-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94:1277-88.
- Stilwell GT. 2012. Plano vacinal em vitelos. *Agrotec: revista técnico-científica agrícola*. Nº 2: 28-9.
- Stilwell GT. 2013. Cetose. In *Clínica de Bovinos*. Lisboa: Publicações Ciências e Vida, Lda. p. 212-4.

- Swenson MJ. 1993 Dukes' Physiology of Domestic Animals, 11th ed., Cornell Univ. Press. Itaca and London.; 41-3.
- Swinkels JM, Hogeveen H, Zadoks RN. 2005. A Partial Budget Model to Estimate Economic Benefits of Lactational Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Dairy Sci.*, 88(12):4273–87.
- Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Pacsa AS. 1985. The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity; unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.*, 7:121-8.
- Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicola D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2004. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. USA: Lippincott Williams & Wilkins. pp.403-11
- Tóthova C, Nagy O, Kováč G. 2014. Relationship between some variables of protein profile and indicators of lipomobilization in dairy cows after calving. *Archiv Tierzucht*, 57(19): 1-9.
- Tóthova C, Nagy O, Kovac, G. 2016. Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. *Vet. Med.*, 61(9):475-96.
- Trevi E, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E, G. Bertoni G. 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 93: 695-704.
- Uribe HA, Kennedy BW, Martin SW, Kelton DF. 1995. Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 78:421-30.
- Urton G, v. Keyserlingk MAG, Weary DM. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.*, 88:2843-49.
- Vazquez P, Garrido JM, Molina E, Geijo MV, Gomez N, Perez V, Sevilla IA, Alonso-Hearn M, Cortes A, Juste RA. 2014. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *Span J. Agric. Res.*, 12 (4):1049.
- Vernon RG, Houseknecht KL. 2000. Adipose tissue: beyond an energy reserve. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*, Cronjé (editor), CABI Publishing, 171-86.
- Vince GS, Johnson PM, Gatenby P. 2001. *Human Reproductive Immunology*. Second ed. Mosby, London.
- Von Keyserlingk MAG, Rushen J, de Passillé AM, Weary DM. 2009. Invited review: The welfare of dairy cattle - Key concepts and the role of science. *J. Dairy Sci.*, 92(9):4101-11.
- Vreugdenhil ACE, Dentener MA, Snoek AMP, Greve JWM, Buurman WA. 1999. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J. Immunol.*, 163:2792–8.
- Waldron MR, Nishida T, Nonnecke BJ, Overton TR. 2003. Effect of lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 86:3447-59.
- Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J. Vet. Intern Med.*, 14:569-77.

- Weinberg ED. 1987. Pregnancy-associated immune suppression: risks and mechanisms. *Microb. Pathog.*, 3:393.
- West HJ. 1990. Effect on liver function of acetonemia and the fat cow syndrome in cattle. *Res. Vet. Sci*, 48:221–7.
- Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Dhand NK, Plain KM. 2017. Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC Vet. Res.*, 13(1):328.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63(1):102-17.
- Wiltbank MC. 2008. Prevention and treatment of retained placenta. In: Annual meeting intermountain nutrition conference, 10, 2008, Salt Lake City. *Anais...* Salt Lake City: Utah Agricultural Experiment Station, p. 81-92.
- Wolfová M, Štípková M, Wolf J. 2006. Incidence and economics of clinical mastitis in five Holstein herds in the Czech Republic. *Preventive Vet. Med.*, 77(1-2):48–64.
- Wyle FA, Kent JR. 1977. Immuno-suppression by sex steroid hormones. The effect upon PHA- and PPD-stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 27:407-15.
- Yaqoob P, Calder PC. 2007. Fatty acids and immune functions: new insights into mechanisms. *Br. J. Nutr.*, 98 (Supl.):41-5.
- Zambrano WJ, Marques Jr. AP. 2009. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras do pré-parto ao quinto mês da lactação. *Zootec. Tropical*, 27:475-88.
- Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip TA, Schuberth HJ. 2000. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology*, 54:771-86.
- Zhang WY, Schwartz E, Wang Y, Attrep J, Li Z, Reaven P. 2006. Elevated Concentrations of Nonesterified Fatty Acids Increase Monocyte Expression of CD11b and Adhesion to Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*, 26:514-9.